THATIANA EVILEN DA SILVA

**Papel do gene *DHX37* na etiologia dos distúrbios do
desenvolvimento sexual 46,XY associados a anormalidades do
desenvolvimento gonadal**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutora em Ciências

Programa: Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Sorahia Domenice

Co-orientadora: Profa. Dra. Luciani Renata Silveira de
Carvalho

Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011.
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP.

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Thatiana Evilen da

Papel do gene *DHX37* na etiologia dos distúrbios do desenvolvimento sexual
46,XY associados a anormalidades do desenvolvimento gonadal / Thatiana
Evilen da Silva -- São Paulo, 2017.

**Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.**

Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Sorahia Domenice.

Coorientadora: Luciana Renata Silveira de Carvalho

Descritores: 1.Gene *DHX37* 2.Mutação 3.Sequenciamento de nucleotídeos
em larga escala 4.Testículos/anomalias 5.Disgenesia gonadal 46,XY
6.Transtornos do desenvolvimento sexual

USP/FM/DBD-300/17

Este trabalho foi realizado na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM 42 da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade da São Paulo (HC-FMUSP), com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Demanda Social), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2013/02162-8) e a Fundação da Faculdade de Medicina (FFM).

Dedicatória

**Aos meus queridos e amados
mãe e pai.**

Agradecimento

Graças dou à Ele (Deus) por permitir fazer esse trabalho e ainda usufruir o melhor desta terra. Muitas lutas e vitórias estarão registradas eternamente em meu coração, as quais me serviram para defender os meus conceitos e valores, mas sempre zelando por meu próximo. Além disso, permitiu que pessoas incríveis me ajudassem em meu crescimento profissional e humano.

Aos meus pais que sempre me incentivaram e deram um suporte para que eu finalizasse os meus estudos (no momento, o DOUTORADO). Sempre e eternamente serão amados!

À minha linda família e aos amigos que foram companheiros, torceram e oraram por mim! O MEU MUITO OBRIGADO! Amo vocês: Le, Ge, Gle, Pri, Fê e Lolo, Gut, Samu.

Às Dra. Sorahia e Dra. Luciani por me ajudarem em todos os momentos e sempre me incentivarem indicando caminhos que devo trilhar para o sucesso e qualidade do desenvolvimento do meu trabalho. Obrigada querida Dra Sorahia pela primeira entrevista para me tornar a sua aluna de mestrado e hoje pela finalização do doutorado! Mui ricos foram os seus conselhos. Muitos desafios enfrentei, mas tudo foi para o bem.

À Dra. Berenice B. Mendonça pela orientação, suporte e o cuidado na realização deste trabalho. Por acreditar que pudéssemos trazer uma esperança aos pacientes compartilhando o conhecimento sobre as causas que levaram a doença (DDS).

Ao Dr. Antonio Marcondes Lerário pela ajuda e apoio a minha pesquisa principalmente quando realizei o estágio sanduiche na Universidade de Michigan (EUA).

A todos os pesquisadores do Lim-42 por suas sugestões e suporte durante a execução do meu projeto.

Às secretárias Nilda e Rosangeli e às funcionárias Dra. Mirian Yumie Nishi, Dra. Luciana Montenegro, Mariana Funari, Mara, Cidinha, Fran, Cristina Rossi, Graça e Suéli por apoiarem o desenvolvimento desse trabalho, pela ajuda constante e amizade especial.

Aos meus queridos amigos e amados colegas do LIM-42, LIM-03, grupo de DDS e do Centro de Bioterismo da FMUSP que tornam o ambiente maravilhoso ao compartilhamos nossas histórias e valores.

Aos pacientes que se dispuseram para a realização da pesquisa e estiveram envolvidos até o fim deste trabalho!

Epígrafe

**“Posso todas as coisas naquele que me fortalece”
Filipenses 4:13 (ARC95)**

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta Tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

Sumário

1. Introdução	1
1.1 Determinação gonadal	2
1.1.1 Genes que participam do desenvolvimento gonadal masculino	2
1.2 Diferenciação da genitália masculina	4
1.3 Distúrbios do desenvolvimento sexual (DDS).....	4
1.3.1 Distúrbios de desenvolvimento sexual 46,XY.....	5
1.3.2 Distúrbios do desenvolvimento sexual 46,XY associados a anormalidades do desenvolvimento gonadal	6
1.3.3 Síndrome de regressão testicular embrionária (SRTE) em pacientes com DDS 46,XY	7
1.3.4 Investigação da etiologia molecular das disgenesias gonadais 46,XY	7
2. Justificativa	11
3. Objetivos	13
4. Pacientes e Métodos	15
4.1 Considerações Éticas	16
4.2 Pacientes	16
4.2.1 Descrição fenotípica dos pacientes com SRTE familiar	16
4.2.2 Descrição fenotípica dos pacientes com SRTE esporádicos.....	17
4.3 Grupo de indivíduos controles.....	18
4.4 Análise Molecular.....	18
4.4.1 Extração do DNA a partir de sangue periférico.....	19
4.4.3 Desenho e sequenciamento do painel customizado de genes envolvidos em DDS.....	23
4.4.4 Amplificação de DNA genômico por reação de polimerização em cadeia (PCR)	24
4.4.5 Sequenciamento automático direto (método de Sanger)	26
4.4.6 Análise do efeito fundador nas famílias 1 e 2 com a variante p.Arg308Gln	27
4.4.7 Análise de interação de proteína por ferramentas de bioinformática	27
4.4.8 Análise estatística	27
4.4.9 Análise do padrão de metilação da região promotora do gene <i>DHX37</i>	27
4.5 Análises histológica e imunohistoquímica.....	30
5. Resultados	33
6. Discussão.....	63
7. Conclusões	73
8. Referências	76
9. Anexos.....	85

Listas

Lista de Abreviaturas e Siglas

Aa	Aminoácido
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Gln	Glutamina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
His	Histidina
Pro	Prolina
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
ABRAOM	Arquivo Brasileiro Online de Mutações
ACMG	American College Medical Genetics
AKT	Proteína quinase B
AMH	Hormônio anti-Mulleriano
AXIN1	Gene codificador da proteína Axin-1
CTNNB1	Gene codificador da proteína humana β -catenina
CNVs	Variações no número de cópias
DAX1	Sexo reverso dosagem-sensitivo, região crítica de hipoplasia adrenal, gene 1
DDS	Distúrbio do desenvolvimento sexual
DGC	Disgenesia gonadal completa
DGP	Disgenesia gonadal parcial
DHH	Gene homólogo “Desert hedgehog”
DHX15	DEAH-Box Helicase 15
DDX5/p68	DEAD-Box Helicase 5
DHX37	DEAH-Box Helicase 37
DHX36	DEAH-Box Helicase 36
DMRT1	Fator de transcrição relacionado com “doublesex” e “mab-3”
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dpc	Dias pós coito
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
dUTP	Deoxiuridina trifosfatase
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
ERK	Quinase reguladora de sinal extracelular

ESP6500	Projeto de sequenciamento exômico
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FGFR	Receptor dos fatores de crescimento de fibroblastos
FOG2	Proteína ligante a GATA 2
Fst	Folistatina
GATA4	Fator de transcrição que se liga a sequência de DNA “GATA”
GNOMAD	Genome Aggregation Database
Indels	Termo molecular para inserções e deleções no DNA
IGV	Iterative Genomic Viewer
c-JNK	c-Jun N terminal quinase extracelular
L-Pgds	Lipocalina- pro3staglandina D2 sintetase
MAPK / MEK	Proteína quinase ativada por mitógenos
NR5A1/SF1	Receptor nuclear subfamília 5, grupo A, membro 1/ Fator esteroideogênico 1
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
Pgd2	Prostaglandina D2 sintetase
PTGDS	Gene codificador da proteína Prostaglandina D2 sintetase
RA	Ácido retinóico
RAR	Receptor do ácido retinóico
RAF	Oncogene viral homólogo de leucemia murino v-raf-1
RNA	Ácido ribonucléico
RAS	Oncogene relacionado com tumores espontâneos de tireoide
RHOA	Membro A da Família de gene homólogo Ras
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
SELA	Sequenciamento exômico paralelo de larga escala
SEPLE	Sequenciamento exômico paralelo de larga escala
SOX9	“SRY –box 9”
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único ou polimorfismo de nucleotídeo simples
SRY	Região determinante do sexo no cromossomo Y
TE	Tampão Tris-EDTA
WNT4	“wingless-type MMTV integration site family, member 4”

WT1

Gene supressor do Tumor de Wilms 1

Lista de Símbolos

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
µmol	Micromol
min	Minutos
mM	Milimol
ng	Nanograma
nM	Nanomol
°C	Graus Celsius
pg/mL	Picograma por mililitro
pmol	Picomol
RPM	Rotações por minuto
U	Unidade
UI/L	Unidade internacionais por litro

Lista de Figuras (no texto)

Figura 1 -	Rede de interação gênica no desenvolvimento gonadal fetal em mamíferos.....	1
Figura 2 -	Heredogramas das duas famílias não relacionadas portadoras de SRTE familiar.....	17
Figura 3 -	Classificação dos grupos de pacientes portadores de DDS 46,XY e métodos selecionados para o estudo.....	18
Figura 4 -	Etapas do protocolo pelo kit Nextera Enrichment DNA da empresa Illumina.....	20
Figura 5 -	Etapas do protocolo do kit Infinium Methylation EPIC BeadChip 850K da empresa Illumina.....	28
Figure 6 -	Densidade da intensidade das metilações distribuídas em valores beta (de 0 a 1) entre indivíduo afetado e normal.....	30
Figura 7 -	Imagem de microscopia de luz de corte histológico de testículos adulto com células presentes dentro dos túbulos seminíferos com marcação DHX37.....	32
Figura 8 -	Filtragem das variantes alélicas identificadas pelo SEPLE de duas famílias com SRTE estudadas.....	34
Figura 9 -	Eletroferograma dos membros das duas famílias estudadas, por SEPLE, gerado IGV (Interactive Genomic Viewer).....	35
Figura 10 -	Eletroferograma com a variante c.923C>T (p.Arg308Gln) em heterozigose no DHX37 em membros das duas famílias portadoras de SRTE.....	37
Figure 11 -	Heredogramas das duas famílias não aparentadas portadoras de SRTE familiar com a variante c.923C>T (p.Arg308Gln) no DHX37.....	38
Figura 12 -	Cortes histológicos do tecido gonadal do paciente F1.III2.....	39
Figura 13 -	Corte histológico da gônada direita (GD) do paciente F1.III3.....	40
Figura 14 -	Heredograma da família 2 composta por 8 membros de três gerações.....	41
Figura 15 -	Aspecto da genitália externa do paciente índice F2.II4.....	41
Figura 16 -	Eletroferograma (A) e heredograma (B) do paciente (CE1.II1) portador de SRTE esporádico.....	44
Figura 17 -	Eletroferograma (A) e heredograma (B) do paciente (CE2.II3) portador de SRTE esporádico.....	46
Figura 18 -	Aspecto das gônadas da paciente CE2.II3.....	48

Figura 19 -	Eletoferograma (A) e heredograma (B) do paciente (CE3.II4) portador de SRTE esporádico.....	48
Figura 20 -	Aspecto das gônadas da paciente CE3.II4.....	50
Figura 21 -	Eletoferograma (A) e heredograma (B) do paciente (CE4.II4) portador de SRTE esporádico.....	51
Figura 22 -	Aspecto da genitália externa do paciente CE4.II4.....	52
Figura 23 -	Localização das variantes na proteína do DHX37 identificadas pelo SEPLE e Sanger.....	54
Figure 29 -	Redes de interações entre DHX37 e outras proteínas envolvidas na via MAPK.....	56
Figura 30 -	Vinte e nove marcadores foram utilizados para análise da região do cromossomo 12q, que está localizada a variante p.Arg308Gln, nas duas famílias não aparentadas (F1 e F2).....	57
Figura 31 -	Heatmap representando a densidade dos valores de beta identificados nos membros das famílias 1 e 2 e controles normais do gene DHX37.....	59
Figure 32 -	Localização da metilação ocorrida na TSS a 200 pb antes da região 5'UTR do gene DHX37.....	60
Figura 33 -	Imagens de microscopia de luz de corte histológico de tecidos testiculares de indivíduos normais de diferentes idades com marcação do DHX37 nas células germinativas.....	61
Figura 34 -	Imagem de microscopia de luz de corte histológico de testículo adulto de um indivíduo com 13 anos de idade com marcação DHX37 ausente nas células de Sertoli.....	62
Figura 35 -	Esquema representativo da participação do DHX37 no processo de determinação gonadal masculino.....	71

Lista de Figuras (Anexos)

Figura 24 -	Alinhamento da proteína DHX37 de diferentes espécies com a variante p.Ala48Thr, indicada com uma caixa preta vazada, gerado pelo Polyphen.....	94
Figura 25 -	Alinhamento da proteína DHX37 de diferentes espécies com a variante p.Arg151Trp, indicada com uma caixa preta vazada, gerado pelo Polyphen.....	95
Figura 26 -	Alinhamento da proteína DHX37 de diferentes espécies com a variante p.Arg308Gln, indicada com uma caixa preta vazada, gerado pelo Polyphen.....	96

- Figura 27 -** Alinhamento da proteína DHX37 de diferentes espécies com a variante p.Arg674Trp, indicada com uma caixa preta vazada, gerado pelo Polyphen.....97
- Figura 28 -** Alinhamento da proteína GATA4 de diferentes espécies com a variante p.Pro368Arg, indicada com uma caixa preta vazada, gerado pelo Polyphen.....98

Lista de Tabelas (no texto)

Tabela 1 -	Classificação dos distúrbios do desenvolvimento sexual.....	5
Tabela 2 -	Genes envolvidos na etiologia da disgenesia gonadal (DG) 46,XY.....	8
Tabela 3 -	Listas dos 62 genes que foram estudados no painel customizado para DDS.....	23
Tabela 4 -	Sequências de oligonucleotídeos específicos para amplificação dos 27 éxons do <i>DHX37</i> e para o éxon 6 do <i>GATA4</i>	24
Tabela 5 -	Protocolo de amplificação para os 27 éxons do gene <i>DHX37</i>	25
Tabela 6 -	Protocolo de amplificação para o éxon 6 do gene <i>GATA4</i>	25
Tabela 7-	Titulação e fonte do anticorpo primário utilizado no estudo imunohistoquímico da proteína <i>DHX37</i> nos diferentes tecidos testiculares humanos.....	32
Tabela 8 -	Fenótipo dos pacientes portadores de síndrome de regressão testicular embrionária (SRTE) familiar com variante alélica no <i>DHX37</i> identificada por SEPLE.....	43
Tabela 10 -	Fenótipo dos pacientes portadores de síndrome de regressão testicular embrionária (SRTE) e disgenesia gonadal 46,XY esporádicos com variantes alélicas identificadas no <i>DHX37</i>	53

Lista de Tabelas (Anexos)

Tabela 9 -	Dados da análise de predição <i>in silico</i> das variantes identificadas em 8 pacientes com DDS 46,XY por anormalidades do desenvolvimento gonadal.....	90
Tabela 11 -	Frequência genotípica e alélicas dos pacientes com DG 46,XY e dos indivíduos Brasileiros controles saudáveis e não saudáveis dos bancos de dados abraOM, SELA, LIM42 e nossa coorte de pacientes.....	91
Tabela 12 -	Variantes missense no <i>DHX37</i> e <i>GATA4</i> encontradas nos bancos de dados populacionais 1000 Genomes, ExAC, Ensembl, ESP6500 e gnomAD.....	92
Tabela 13 -	Região promotora TSS200 hipometilada no gene <i>DHX37</i> encontrada no pai da família 1 em relação aos seus filhos, membros da família 2 e controles.....	93

Resumo

Silva TE. **Papel do gene *DHX37* na etiologia dos distúrbios do desenvolvimento sexual 46,XY associados a anormalidades do desenvolvimento gonadal** [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2017.

Os distúrbios do desenvolvimento sexual (DDS) 46,XY por anormalidades do desenvolvimento gonadal são doenças genéticas heterogêneas. Os testes genéticos que utilizam o sequenciamento de genes candidatos pelo método de Sanger é efetivo para o diagnóstico etiológico em menos de 40% desses pacientes. O sequenciamento de nova geração é uma ferramenta eficaz no diagnóstico de pacientes com DDSs. No presente estudo, utilizamos o sequenciamento exômico paralelo em larga escala (SEPLE) para identificar variantes alélicas potencialmente causadoras dos DDSs. Pacientes com síndrome de regressão testicular embrionária (SRTE) familiar, membros de duas famílias brasileiras não relacionadas (família 1: dois irmãos afetados e pais não afetados e família 2: indivíduo índice, irmã não afetada e sobrinho afetado, filho da irmã do índice) foram selecionados inicialmente. Estes pacientes apresentavam micropenis, testículos ausentes ou disgenéticos e ausência de útero. O DNA genômico foi extraído de leucócitos de sangue periférico e o SEPLE foi realizado usando a plataforma Illumina-HiSeq-2500. Uma nova variante em heterozigose, c.923C>T, (p.Arg308Gln), no *DHX37* foi identificada em todos os membros afetados das duas famílias brasileiras. O sequenciamento por Sanger confirmou a presença da variante em todos os afetados, no pai não afetado da F1 e na mãe não afetada do F2. A presença de efeito fundador da variante nestas duas famílias foi excluído, através da análise de 29 marcadores localizados no cromossomo 12q. Trinta e cinco pacientes com 46, XY DDS por anormalidades do desenvolvimento gonadal (6 com SRTE e 29 com disgenesia gonadal) esporádicos foram incluídos na pesquisa de variantes no *DHX37* por Sanger ou por painel de genes candidatos (Plataforma Illumina-HiSeq-2500). As variantes c.923C>T, (p.Arg308Gln) em heterozigose e a variante c.451G>A, (p.Arg151Trp) em homozigose foram identificadas no *DHX37* em dois pacientes com SRTE esporádicos. As variantes c.142C>T (p.Ala48Thr) e c.2020G>A (p.Arg674Trp) foram identificadas em heterozigose em dois pacientes esporádicos com disgenesia gonadal (DG). De acordo com o American College of Medical Genetics e Genomics guideline (ACMG), as variantes foram classificadas como provavelmente patogênicas (p.Arg308Gln e p.Arg674Trp), variante de significância clínica incerta (p.Arg151Trp) e variante benigna (p.Ala48Thr). Três variantes identificadas no *DHX37* eram causadoras de doença em mais de três das ferramentas de previsão *in silico* utilizadas. Nenhuma das novas variantes no *DHX37* foi encontrada nas bases de dados da população disponíveis (EXAC, 1000GENOME, ESP6500, gnomAD e abraOM) com uma frequência maior do que 0,01%. O padrão de metilação da região promotora do *DHX37* dos membros afetados e não afetados das famílias 1 e 2 e controles femininos e masculino foi analisado utilizando o ensaio Infinium Methylation EPIC BeadChip (Illumina). Um sítio CpG hipometilado na região promotora do *DHX37* foi observado apenas no pai da F1 quando comparado com as amostras dos filhos afetados, membros da F2 e controles. A análise imuno-histoquímica do padrão de expressão da proteína DHX37 foi realizada em amostras de testículos de oito indivíduos com diferentes idades cronológicas. Esta análise revelou que no tecido testicular de recém-nascidos, indivíduos em idade puberal e adultos, o DHX37 estava expresso em células germinativas em diferentes estágios de maturação (presentes nas espermatogonias, espermatócitos e espermátides e ausente nos espermatozoides). Este achado sugere que a proteína DHX37 pode ter um papel no processo de desenvolvimento das células germinativas. O *DHX37* (12q24.31) codifica

uma proteína DEAH (Asp-Glu-Ala-His) que pertence às famílias RNA helicases cujos membros estão envolvidos em quase todos os processos relacionados ao RNA, bem como ao controle do crescimento, proliferação e processos de diferenciação celular. Pacientes descritos com deleções na região 12q24.31, que contém o *DHX37*, apresentavam características sindrômicas e anormalidades genitais, como hipospadias ou micropenis. A presença de anormalidades genitais nestes pacientes reforça a hipótese de que o *DHX37* está envolvido na etiologia dos DDSs 46,XY. Em conclusão, identificamos fortes evidências de um novo gene, o *DHX37*, envolvido no processo de desenvolvimento e manutenção das gônadas masculinas. Estudos complementares serão necessários para esclarecer o papel exato do *DHX37* nas redes reguladoras de genes que controlam o desenvolvimento sexual humano.

Descritores: gene *DHX37*; mutação; sequenciamento de nucleotídeos em larga escala; testículos/anomalias; disgenesia gonadal 46,XY; transtornos do desenvolvimento sexual.

Abstract

Silva TE. **Role of *DHX37* gene in the etiology of 46,XY disorders of sex development associated with abnormalities of gonadal development** [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”, 2017.

46,XY disorders of sex development (DSD) associated with abnormalities of gonadal development are heterogeneous genetic diseases. Genetics testing using Sanger sequencing of candidate genes is effective for diagnosis in less than 40% of these patients. Next-generation sequencing has been a powerful genetic diagnostic tool in the investigation of DSD patients. In the present study, we used the whole exome sequencing (WES) to identify potentially DSD-causing allelic variants. Patients with familial embryonic testicular regression syndrome (ETRS) of two non-related Brazilian families (Family 1 (F1)- two affected brothers and the unaffected parents; Family 2 (F2)- index patient, his unaffected sister and an affected nephew, the son of the index's sister) were initially selected. The patients had micropenis, absent or dysgenetic testes and no uterus. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leucocytes and WES was performed using the Illumina-HiSeq-2500 platform. A novel heterozygous variant, c.923C>T, (p.Arg308Gln), in the *DHX37* gene was identified in all affected members of the two Brazilian families and in F1's father. Sanger sequencing confirmed the presence of the variant in the all of the affected members and in F1's father and in F2's mother. The presence of a founder effect in these families was investigated using 29 markers located on chromosome 12q and was ruled out. Thirty-five additional patients with sporadic 46,XY DSD associated with abnormalities of gonadal development (6 with ETRS and 29 with gonadal dysgenesis) were screened for variants in this novel candidate gene using Sanger or NGS-based targeted sequencing panel of DSD candidate genes (Illumina-HiSeq-2500 platform). The heterozygous variant c.923C>T (p.Arg308Gln) and the homozygous variant c.451G>A, (p.Arg151Trp) in the *DHX37* were identified in two sporadic SRTE patients. The heterozygous variants c.142C>T (p.Ala48Thr) and c.2020G>A (p.Arg674Trp) were identified in two sporadic 46,XY gonadal dysgenesis (GD) patients. According to the American College of Medical Genetics and Genomics guidelines (ACMG) the variants were classified as likely pathogenic (p.Arg308Gln, p.Arg674Trp), variant of uncertain clinical significance (p.Arg151Trp and) and benign variant (p.Ala48Thr); and all three of them were disease causing in more than three of the *in silico* prediction tools used. None of the novel *DHX37* variants identified were found in the available population databases (EXAC, 1000GENOME, ESP6500, gnomAD and abraOM) in more than 0.01%. Segregation analysis of *DHX37* allelic variants was performed in 5 families and resulted in the autosomal dominant with incomplete penetrance and recessive inheritance patterns. DNA methylation pattern of the *DHX37* promotor region of F1 and F2's affected and unaffected members and gender-matched controls was analyzed using the Infinium Methylation EPIC BeadChip (Illumina). One hypomethylated CpG site in the promoter region of the *DHX37* was only observed in F1's father compared with the affected siblings, F2's members and controls. Immunohistochemical analysis of DHX37 protein expression pattern was performed on testis samples of eight individuals with different chronological ages. This analysis revealed that in the testicular tissue of newborns, pubertal and adults, the DHX37 was expressed in different stages of germ cells maturation (present in spermatogonia, spermatocytes and spermatids and absent in spermatozoa). This finding suggests that DHX37 protein might have a role in the process of germ-cells development. The *DHX37* (12q24.31) encodes a DEAH (Asp-

Glu-Ala-His) protein of the RNA helicase families, whose members are involved in almost all RNA-related process such as the control of cell growth, proliferation and differentiation processes. Previously described patients with 12q 24.31 deletions, which contains *DHX37*, showed syndromic features and genital abnormalities as hypospadias or micropenis. This phenotype reinforces the hypothesis that *DHX37* is involved in the etiology of disorders in male sex development. In conclusion, a novel gene, the *DHX37*, involved in the process of development and maintenance of male gonads was identified. Further studies will be necessary to clarify the exact role of the *DHX37* in the gene regulatory networks controlling human sex development.

Descriptors: *DHX37* gene; mutation; high-throughput nucleotide sequencing; testis/abnormalities; gonadal dysgenesis, 46,XY; disorders of sex development.

1. Introdução

O desenvolvimento sexual nos mamíferos constitui um processo extremamente complexo. Em humanos, este processo pode ser dividido didaticamente em três etapas consecutivas e interdependentes. A primeira etapa corresponde ao estabelecimento do sexo cromossômico, que ocorre na fertilização e no qual o conteúdo cromossômico 46,XY e 46,XX são identificados respectivamente no sexo masculino e no sexo feminino. A segunda etapa do desenvolvimento sexual consiste no processo de determinação gonadal (sexo gonadal), que compreende a transformação do tecido gonadal bipotencial em uma gônada feminina ou masculina. Um complexo sistema composto por inúmeros genes e proteínas sinalizadoras participa desta etapa (1) (Figura 1).

Figura 1 - Rede de interação gênica no desenvolvimento gonadal fetal em mamíferos. Genes que desempenham um papel conhecido no desenvolvimento gonadal em humanos e camundongos são representados com a letra maiúscula ou somente em camundongos com a letra minúscula. Genes que atuam como ativadores e bloqueadores na via masculina estão representados na cor azul, e na via feminina representados na cor vermelha. Adaptado de Ono e Harley (2).

A etapa da diferenciação sexual compreende todos os processos, que ocorrem após a formação da gônada fetal e estão relacionados a diferenciação da genitália interna e externa. Na puberdade, os hormônios gonadais promoverão o desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários, a aceleração do crescimento, e início da função reprodutiva (1).

1.1 Determinação gonadal

As etapas iniciais do desenvolvimento gonadal humano são idênticas nos embriões femininos e masculinos. Nas primeiras semanas de gestação (4^a - 5^a semanas), as células germinativas primordiais (CPGs) ganham mobilidade e migram do saco vitelino através do mesentério dorsal até alcançar a fenda gonadal (1,3). As células germinativas desempenham papéis diferentes na organização testicular e ovariana. As evidências acumuladas indicam que o desenvolvimento testicular ocorre normalmente na ausência de células germinativas (3), diferentemente da gônada feminina, na qual a ausência das células germinativas primordiais impede o desenvolvimento ovariano normal. A formação dos folículos ovarianos, unidades funcionais do ovário, não ocorre adequadamente na ausência das células germinativas primordiais (4,5).

Porém, estudos *in vitro* recentes demonstraram que as células germinativas poderiam influenciar o desenvolvimento testicular, especialmente a proliferação e a diferenciação das células de Sertoli por via sinalização parácrina. Além disso, a ausência de comunicação entre as células germinativas por ação autócrina indica que essa seria uma maneira de mantê-las vivas por evitar o estresse celular e, consequentemente ativação do processo apoptótico (6). Outros estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que as células germinativas, mais especificamente nas fases dos espermatócitos paquítono e das espermatídes imaturas, teriam um papel fundamental de controle da produção de inibina pelas células de Sertoli (como resposta inibitória ao hormônio do FSH) em ratos imaturos. Enquanto, em ratos adultos foi possível observar esse comportamento na fase das espermatídes maduras, sugerindo que as espermatídes são os maiores reguladores da função das células de Sertoli (7,8).

1.1.1 Genes que participam do desenvolvimento gonadal masculino

No processo normal de determinação testicular, a presença do gene *SRY*, localizado no braço curto do cromossomo Y, é fundamental para ativar a cascata de genes da via masculina, da qual participam os genes *SOX9* (*Sex Determining Region Y*-

box9), *PGD2* (*Prostaglandin D2* ou *PTDGS*), *FGF9* (*Fibroblast growth factor 9*), *GATA4-ZFPM2* (*GATA binding protein 4- zinc finger protein, FOG family member 2*), *WT1* (*Wilms tumor gene 1*), *DHH* (*Desert hedgehog*), que serão responsáveis pela transformação da gônada indiferenciada (bipotencial) na gônada masculina (testículo) (Figura1) (2).

A participação da via MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) no processo de determinação testicular foi demonstrada em mamíferos (9). No desenvolvimento gonadal masculino humano, a ligação do MAP3K1 à proteína RHOA promove a fosforilação normal de p38 e ERK1/2, o que determina um bloqueio da via da β -catenina pela MAP3K4. Já no desenvolvimento feminino, ocorre uma hiper fosforilação de p38 e ERK1/2, o que promove a ativação da via da β -catenina e o bloqueio da via de retroalimentação positiva do SOX9, o que impede o desenvolvimento testicular normal (10).

Na ausência do gene *SRY*, a expressão de genes da via de feminização gonadal, tais como o *WNT4* (*Wingless-type MMTV integration site family, member 4*), o *RSPO1* (*R-spondin 1*), o *CNNTB1* (*b-catenin - catenin, β 1*), o *FOXL2* (*Forkhead box L2*) e o *FST* (*Follistatin*), determina a transformação da gônada bipotencial em um ovário (Figura 1) (2).

No camundongo durante os períodos embrionário e pós-natal foi observado que o gene *Dmrt1* (*Doublesex and mab-3 related transcription factor 1*; OMIM*602424) mantém ativa a cascata masculina por ação inibitória controlando a expressão do gene *Foxl2* (OMIM*605597). Ao contrário, na ausência do *Dmrt1*, na presença do *Foxl2* na gônada masculina as células de Sertoli passam a se diferenciar em células da granulosa, células típicas do folículo ovariano. No tecido ovariano é possível observar a mesma rediferenciação celular (células da granulosa para células de Sertoli) com a ausência do *Foxl2*. Além disso, o *Dmrt1* desempenha um papel regulador no controle do desenvolvimento e diferenciação das espermatogônias, estabelecendo a opção da divisão celular por mitose ao invés da divisão celular meiótica para as células germinativas masculinas (11,12).

1.2 Diferenciação da genitália masculina

Uma vez tendo ocorrido a determinação testicular, a organização da estrutura testicular se estabelece através da formação dos cordões testiculares pelo agrupamento das células de Sertoli, que envolvem as células germinativas primordiais. Os cordões testiculares darão origem aos túbulos seminíferos, os túbulos retos e a rete testis (13).

A partir da 7ª semana de gestação, as células de Sertoli secretam o HAM, uma glicoproteína cuja ação promove a morte das células dos ductos de Müller e impede o desenvolvimento das estruturas do órgão reprodutor feminino (fimbrias, trompas de Falópio, útero e terço proximal da vagina). Moléculas sinalizadoras, como a DHH, secretadas pelas células de Sertoli estimulam de forma parácrina a diferenciação das células de Leydig. As células de Leydig fetais sintetizam o hormônio testosterona, que age nos ductos de Wolff promovendo o desenvolvimento das estruturas do órgão reprodutor masculino (ductos deferentes, epidídimo, vesícula seminal e ductos ejaculatórios). A testosterona secretada pelo testículo fetal é convertida periféricamente pela ação da enzima 5-alfa-redutase tipo 2 em diidrotestosterona (DHT), que age nos tecidos precursores da genitália externa. Sob a ação da DHT, o tubérculo genital origina a glândula peniana e as pregas uretrais fundem-se ventralmente, formando o corpo peniano. As pregas labioescrotales crescem unindo-se na linha mediana, formando a bolsa escrotal, enquanto a uretra prostática se origina a partir do seio urogenital. O processo de formação da genitália externa masculina se completa por volta da 12ª semana de gestação, enquanto o crescimento peniano ocorre principalmente nos dois últimos trimestres da gestação (3,14,15).

1.3 Distúrbios do desenvolvimento sexual (DDS)

Os indivíduos portadores de distúrbios do desenvolvimento sexual (DDS) apresentam um amplo espectro fenotípico, que pode variar desde distúrbios do desenvolvimento puberal e infertilidade a diferentes graus de atipia genital afetando 1 em 4,500-5,500 da população mundial (16). O termo DDS é definido como “condições

congenitas na qual o desenvolvimento cromossômico, gonadal ou anatômico é atípico” (17). Diversos mecanismos fisiopatológicos estão envolvidos na etiologia dos DDS, sendo classificados em três grandes grupos: DDS por anormalidade cromossômica, DDS 46,XY e DDS 46,XX (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação dos distúrbios do desenvolvimento sexual.

Distúrbios do Desenvolvimento Sexual (DDS)
<i>DDS por anormalidade do sexo cromossômico</i>
45,X (síndrome Turner e variantes)
47,XXY (síndrome Klinefelter e variantes)
45, X/46, XY (Disgenesia gonadal mista, DDS ovotesticular)
46, XX/46, XY (DDS ovotesticular - quimera)
<i>DDS 46,XY</i>
Distúrbio do desenvolvimento testicular (disgenesia gonadal completa e parcial, agenesia e regressão gonadal),
Distúrbio da síntese da testosterona (defeito no receptor de LHCG, defeitos da biosíntese de esteróides da suprarrenal e testicular),
Distúrbio da ação da testosterona (insensibilidade androgênica completa e parcial),
Distúrbios da metabolização de testosterona (defeito da enzima 5 alfa redutase 2)
Outros (hipospádia, malformações urogenitais)
DDS de causa indeterminada
<i>DDS 46,XX</i>
Distúrbio do desenvolvimento ovariano (disgenesia gonadal, DDS ovotesticular, DDS testicular),
Por excesso de andrógenos (de origem fetal, fetoplacentaria ou materna),
Outros (atresia vaginal, malformações urogenitais)
DDS de causa indeterminada

Adaptado de Hughes *et al.* (17).

1.3.1 Distúrbios de desenvolvimento sexual 46,XY

Os DDS 46,XY podem ser causados por anormalidades nos genes envolvidos na cascata da determinação e diferenciação sexual masculina, pela presença de defeitos nos genes dos receptores hormonais ou das diferentes enzimas envolvidas nos processos da produção da testosterona e da sua metabolização para DHT (18). Um grupo significativo de pacientes portadores de DDS 46,XY permanece sem diagnóstico etiológico estabelecido, apesar da utilização das dosagens hormonais, dos exames radiológicos, histológicos e de citogenética convencional na sua investigação, eles são classificados como DDS de causa indeterminada. A taxa de incidência de paciente 46,XY com DDS tem sido estimada de 1 para cada 20.000 nascidos (19).

1.3.2 Distúrbios do desenvolvimento sexual 46,XY associados a anormalidades do desenvolvimento gonadal

A gônada embrionária indiferenciada potencialmente desenvolve-se em testículo ou ovário, mas em alguns casos podem ocorrer falhas no processo de desenvolvimento gonadal normal gerando gônadas disgenéticas com morfologia e função anormais.

A etiologia da disgenesia gonadal 46,XY (DG; OMIM*400044) nas formas completa ou parcial está relacionada à ocorrência de anormalidades durante o processo de determinação testicular.

Indivíduos com disgenesia gonadal completa (DGC) 46,XY apresentam fenótipo feminino, com as genitálias externa e interna femininas e a presença de gônadas disgenéticas constituída por tecido fibroso. Normalmente, essas pacientes procuram atendimento médico pela ausência do desenvolvimento de sinais puberais femininos (ausência de telarca e menarca). Em contraste, indivíduos portadores de disgenesia gonadal parcial (DGP) 46, XY apresentam um amplo espectro fenotípico com graus variáveis de virilização dos órgãos genitais externos e do desenvolvimento dos derivados müllerianos e wolffianos. A grande maioria destes pacientes são diagnosticados ao nascimento devido à presença de genitália externa atípica (13). Nestes indivíduos a análise histológica do tecido gonadal identifica frequentemente túbulos seminíferos hipoplásicos associados a áreas de fibrose e hialinização, semelhantes ao estroma ovariano. As gônadas disgenéticas de indivíduos 46,XY apresentam um alto risco para o desenvolvimento de tumor (20). Vários padrões de herança genética foram descritos em casos familiares de disgenesia gonadal 46,XY como o padrão de herança recessiva ligada ao cromossomo X, de doença autossômica de transmissão dominante ou recessiva, com expressão limitada ao sexo masculino (21,22).

As DGs podem se apresentar como uma condição isolada ou associada a outros sinais clínicos, caracterizando as formas sindrômicas da doença (Tabela 2).

1.3.3 Síndrome de regressão testicular embrionária (SRTE) em pacientes com DDS 46,XY

A síndrome da regressão testicular embrionária (SRTE) compreende um grupo de pacientes que apresentam frequentemente genitália externa atípica e ausência de tecido gonadal uni ou bilateralmente. Nestes pacientes ocorrem anormalidades no desenvolvimento dos ductos sexuais internos, frequentemente com involução parcial ou completa dos ductos de Müller e desenvolvimento variável dos derivados wolffianos. Nos pacientes portadores de SRTE o grau de virilização depende do tempo de exposição aos hormônios testiculares até a perda da gônada, podendo resultar desde uma genitália externa feminina normal até uma genitália masculina com micropênis e gônadas não palpáveis. No entanto, o padrão anormal do desenvolvimento dos ductos sexuais e da genitália externa em muitos pacientes, indica que o tecido testicular já era anormal antes de sua regressão. Alguns autores classificam este grupo de pacientes como um espectro dos pacientes portadores de DG parcial 46,XY (23).

1.3.4 Investigação da etiologia molecular das disgenesias gonadais 46,XY

Embora a técnica tradicional de sequenciamento de DNA pelo método de Sanger ainda seja a mais utilizada na investigação diagnóstica dos DDS 46,XY, nos pacientes portadores de anormalidades do desenvolvimento gonadal a eficiência desta metodologia é baixa, permitindo estabelecer o diagnóstico em menos de 40% dos pacientes (24–26). O grande número de genes envolvidos no processo de desenvolvimento testicular, candidatos potenciais para a etiologia das disgenesias gonadais, torna esta abordagem gene a gene, um trabalho árduo e demorado e com uma aplicação diagnóstica limitada na prática clínica (Tabela 2). Variantes alélicas patogênicas nos genes *SRY*, *NR5A1/SF1* e *MAP3K1* são as causas genéticas mais frequentemente encontradas na forma isolada de DG 46,XY, de forma que o estudo destes genes deve ser priorizado na investigação diagnóstica desses pacientes (27–29).

Tabela 2 - Genes envolvidos na etiologia da disgenesia gonadal (DG) 46,XY.

Localização	Fenótipo	Número MIM do fenótipo	Gene/Locus	Número MIM do gene/locus
1p36.12	DG 46,XY, sensível à dosagem	611812	WNT4	603490
5q11.2	DG 46,XY	613762	MAP3K1, MEKK1, MEKK, SRXY6	600982
8q23.1	DG 46,XY	616067, 615542	ZFPM2, FOG2, DIH3, SRXY9, GATA4	603693, 600576
9p24.3	DG 46,XY síndrômica	154230	DEL9p24.3, C9DELp24.3, SRXY4	154230
9q33.3	DG 46,XY	612965	NR5A1, FTZF1, FTZ1, SF1, AD4BP, POF7, SRXY3, SPGF8	184757
10p15.1	DG 46,XY	614279	AKR1C2, DDH2, DD2, HAKRD, SRXY8	600450
11p13	DG 46,XY síndrômica	194080,136680,194070	WT1	607102
12q13.12	DG 46,XY	233420	DHH, SRXY7, GDXYM	605423
16q23	DG 46,XY	400044	WWOX	605131
17q24	DG 46,XY síndrômica e não síndrômica,	616425, 114290	SRXY10, SOX9	616425, 608160
17q25.3	DG 46,XY?	613080	CBX2, M33, SRXY5	602770
Xq13	DG 46,XY síndrômica	309580, 301040	ATRX	300032
Xp21.2	DG 46,XY, sensível à dosagem	300018	DAX1, AHC, AHX, NR0B1, SRXY2	300473
Xp22	DG 46,XY síndrômica	300215	ARX	300382
Yp11.2	DG 46,XY	400044	SRY, TDY, TDF, SRXY1	480000

Adaptado do OMIM (2017; *Online Mendelian Inheritance in Man*, disponível no site: <http://www.omim.or>).

A presença de características síndrômicas em pacientes com DG 46,XY permite a seleção para estudo de genes candidatos relacionados ao fenótipo, o que aumenta muito a probabilidade de sucesso na elucidação da etiologia da DG. Assim, mutações no gene *WT1* estão associadas à etiologia de nefropatias e predisposição ao desenvolvimento de tumor de Wilms, mutações no *SOX9* à displasia campomélica e mutações no *GATA4* a anomalias cardíacas além das anormalidades gonadais (15,30–32).

O excesso de expressão (como múltiplas cópias de genes da via feminina da determinação gonadal) ou a insuficiência da expressão (deleção/haploinsuficiência de

genes masculinizantes) dos genes envolvidos no processo de determinação gonadal causam desequilíbrio das vias gênicas e determinam a formação de gônadas disgenéticas em indivíduos com cariótipo XY (33). Testes genéticos para identificar a variação do número de cópias gênicas utilizando o método de Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) para os genes *SRY*, *SOX9*, *NR0B1/DAX1*, *DMRT1-3*, *NR5A1/SF1*, *WNT4* e *WT1* estão disponíveis no comércio e são úteis na pesquisa etiológica das disgenesias gonadais pelo efeito de dosagem desses genes (Tabela 2). Porém, o uso desta técnica pressupõe a suspeita do(s) gene(s) candidato(s) para a etiologia da disgenesia, o que constitui uma limitação desta metodologia (34).

As técnicas de citogenética molecular, como os microarranjos de hibridização genômica comparativa utilizando oligonucleotídeos (CGH arrays) e polimorfismos de nucleotídeo único (SNP arrays) que avaliam todo o genoma, são sensíveis para detectar pequenas variações no número de cópias de genes ou de fragmentos cromossômicos e permitem a identificação de desequilíbrios genômicos submicroscópicos como microdeleções e microinserções em ampla escala do genoma. Ambas as abordagens são úteis na investigação diagnóstica dos pacientes portadores de DG 46,XY (34–38).

As novas estratégias de sequenciamento de DNA de alto desempenho permitem o sequenciamento e análise de milhares de fragmentos de nucleotídeos em paralelo, gerando cada vez mais dados em menor tempo. A tecnologia de sequenciamento de nova geração é predominantemente uma metodologia de identificação de variantes de DNA, com a capacidade de detectar substituições de pares de bases e de pequenas inserções e deleções envolvendo poucas bases nucleotídicas (34,39).

A utilização do sequenciamento de alto desempenho, sequenciamento exômico ou genômico, na investigação diagnóstica de pacientes com DDS 46,XY, e em particular em pacientes portadores de anormalidades do desenvolvimento gonadal, tem permitido a identificação de novos genes candidatos envolvidos na etiologia dos DDS 46,XY, assim como a identificação de novas variantes alélicas, microdeleções e microinserções em genes conhecidos das vias de determinação e diferenciação sexual (34,40,41).

A técnica de sequenciamento exômico identificou pela primeira vez novas variantes alélicas do gene FOG2/ZFPM2 em portadores de DG 46,XY, membros de duas famílias não aparentadas (42). Estes achados foram confirmados no sequenciamento pelo método de Sanger e vários ensaios biológicos realizados com as proteínas FOG2 mutadas demonstraram uma mudança significativa na atividade biológica das novas proteínas, indicando a associação destas variantes gênicas com a falência do desenvolvimento testicular.

A identificação da primeira mutação com perda de função do gene HHAT (hedgehog acil-transferase) em uma criança com disgenesia testicular e condrodisplasia foi possível com a utilização da técnica de sequenciamento exômico paralelo em larga escala (SEPLE) (43).

Recentemente, Eggers e colaboradores utilizaram a metodologia do sequenciamento de nova geração na investigação etiológica de uma coorte internacional de 278 pacientes com DDS 46,XY (44). Os pesquisadores identificaram 187 variantes alélicas raras em 28 genes reconhecidamente causadores de DDS incluídos em um painel customizado de genes-alvo, constituído por 1031 genes de relevância clínica ou de pesquisa associados ao desenvolvimento gonadal (13 genes para DDS 46,XY e 4 genes para DDS 46,XX), diferenciação gonadal (23 genes), à via esteroidogênica (18 genes) e outras anormalidades gonadais (5 genes). A maioria das variantes identificadas (62%) eram variantes novas. Neste estudo, os autores obtiveram resultados que permitiram estabelecer o diagnóstico genético em: 40% (21/52) dos pacientes com distúrbios do desenvolvimento gonadal, em 60% (22/37) dos pacientes portadores de distúrbios na síntese ou ação androgênica, em 32% (18/56) dos pacientes com hipospádia ou criptorquidismo ou doença síndrômica e em 43% (57/133) dos pacientes com DDS 46,XY de origem desconhecida.

2. Justificativa

O estudo de casos familiares de DDS 46,XY associados a anormalidades do desenvolvimento gonadal é fundamental na identificação de novas variantes e especialmente de novos genes candidatos pela metodologia de sequenciamento de nova geração, devido ao seu grande potencial informativo.

O grande número de pacientes 46,XY portadores de DDS associados a anormalidades no desenvolvimento gonadal sem etiologia genética estabelecida indica que defeitos em um ou múltiplos genes ainda desconhecidos poderiam exercer papel(is) preponderante(s) na determinação testicular.

No presente estudo, visamos contribuir na elucidação da etiologia dos DDS 46,XY e ampliar os conhecimentos das vias gênicas envolvidas no processo de formação e de manutenção do tecido testicular, promovendo um melhor acompanhamento destes pacientes e um aconselhamento genético familiar mais adequado.

3. Objetivos

3. Objetivos

3.1 Estabelecer o diagnóstico molecular em pacientes com DDS 46,XY associados a anormalidades do desenvolvimento gonadal:

- a. Pesquisar a presença de variantes alélicas potencialmente causadoras de doença em pacientes com SRTE familiar por sequenciamento exômico paralelo em larga escala;
 - b. Ampliar o estudo através da análise do(s) novo(s) gene(s) candidato(s) selecionado(s) em uma coorte de pacientes com DDS 46,XY associados anormalidade do desenvolvimento gonadal esporádicos;
 - c. Caracterizar a expressão da(s) proteína(s) selecionada(s) potencialmente causadora(s) de doença em tecidos testiculares humanos normais;
 - d. Estabelecer um provável mecanismo de participação da(s) nova(s) proteína(s) eventualmente identificada(s) nas vias envolvidas no desenvolvimento gonadal.
-

4. Pacientes e Métodos

4.1 Considerações Éticas

Este projeto de estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (Cappesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (nº 981.037). Todos os pacientes ou tutores legais assinaram o termo de consentimento de livre esclarecimento (TCLE utilizado está disponível no Anexo A).

4.2 Pacientes

Todos os pacientes selecionados para este estudo são acompanhados no Ambulatório da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento (Unidade A1MN 1003) da Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O diagnóstico de DDS 46,XY associados a anomalias do desenvolvimento gonadal baseou-se na avaliação clínica, hormonal, citogenética, radiológica e histológica realizada na investigação etiológica e tratamento dos pacientes com DDS 46,XY seguidos no referido Serviço.

4.2.1 Descrição fenotípica dos pacientes com SRTE familiar

Duas famílias não aparentadas e não consanguíneas de pacientes portadores de DDS 46,XY associados a anormalidades do desenvolvimento gonadal foram inicialmente selecionadas e estudadas por sequenciamento exômico paralelo em larga escala (SEPLE). Os 4 pacientes, membros das duas famílias selecionadas (F1 e F2; Figura 2), apresentavam características fenotípicas muito semelhantes, a saber: presença de genitália externa masculina com micropênis e gônadas não palpáveis, ausência de útero e gônadas disgenéticas ou ausentes no estudo a histológico. Estes pacientes foram classificados como portadores de síndrome de regressão testicular embrionária (SRTE).

Figura 2 - Heredogramas das duas famílias não relacionadas portadoras de SRTE familiar. Pacientes índices são indicados pela seta preta. Todos os afetados do sexo social masculino estão representados pelo quadrado preenchido de cor preta (F1. III2 e III3; F2.II4), e o símbolo quadrado contendo um círculo não preenchido (F2.III2) representa o paciente com cariótipo 46,XY com mudança do sexo de registro masculino para o sexo feminino. ND: DNA não disponível.

4.2.2 Descrição fenotípica dos pacientes com SRTE esporádicos

Na ampliação do estudo inicial, que avaliou os pacientes com doença familiar, uma coorte de 35 pacientes portadores de doença não familiar foi adicionada ao estudo. Os novos pacientes incluídos consistiam em:

- 1) Seis pacientes portadores de SRTE esporádica foram estudados pelo método de Sanger para pesquisa de variantes alélicas no gene candidato identificado,
- 2) Vinte e nove pacientes portadores de disgenesia gonadal (10 - forma completa, 19 - forma parcial) foram estudados inicialmente pelo método de Sanger e finalizado pelo painel customizado para pesquisa de variantes alélicas no gene candidato identificado.
 - a) Os pacientes foram classificadas como:
 - i. Disgenesia gonadal completa: presença de ambas as gônadas em fita, estruturas müllerianas bilaterais e um fenótipo feminino normal.
 - ii. Disgenesia gonadal parcial: caracterizada por diferentes graus de diferenciação testicular, um misto de derivados müllerianos e wolfianos e genitália externa atípica.

Nesta coorte de pacientes, alterações em genes classicamente reconhecidos como membros da cascata da determinação testicular (*SRY*, *NR5A1*, *FGF9*, *FGFR2*, *GATA4*, *MAP3K1*, *DMRT1*, *DHH*, *CBX2*, *DAX*, *FOG2*) foram previamente pesquisados pelo

método de sequenciamento por Sanger e nenhuma variante alélica causadora de doença foi identificada (45).

Um fluxograma contendo informações dos pacientes selecionados e das técnicas utilizadas no estudo está representado na figura 3:

Figura 3 - Classificação dos grupos de pacientes portadores de DDS 46,XY e métodos selecionados para o estudo.

4.3 Grupo de indivíduos controles Brasileiros

Foram selecionados 202 indivíduos controles sem história familiar de infertilidade ou distúrbios do desenvolvimento sexual do banco de DNA do laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM 42 e 777 indivíduos do banco de dados da população Brasileira SELA (composto por 168 pacientes portadores de endocrinopatias não relacionadas aos DDSs e oriundos de diferentes regiões do Brasil) e abraOM (composto por 609 idosos da cidade São Paulo) [disponível no site: <http://abraom.ib.usp.br>]. SELA - Laboratório de sequenciamento em larga escala, multiusuário da Faculdade de Medicina da USP, financiado pela FAPESP (número do processo: 14/50137-5).

4.4 Análise Molecular

Os estudos utilizando técnicas de biologia molecular foram desenvolvidos nos Laboratórios de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 da Disciplina de

Endocrinologia, Laboratório de Citogenética, LIM 03 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP e no Laboratório de Sequenciamento da ESALQ-USP.

4.4.1 Extração do DNA a partir de sangue periférico

As amostras de DNA genômico foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico dos pacientes e familiares selecionados e o DNA genômico foi isolado utilizando o método convencional de extração *salting out* (46). A concentração e a pureza do DNA foram mensuradas pelo espectrofotômetro (Biophotometer Eppendorf, EUA), que se espera A260/280 de 1.8-2.0, e pelo gel de agarose de 1%, respectivamente. A extração foi realizada seguindo-se o protocolo padronizado no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM42 da Disciplina de Endocrinologia pela técnica Cristina Rossi.

4.4.2 Sequenciamento exômico paralelo em larga escala (SEPLE) e bioinformática

Para identificarmos variantes alélica e/ou novos genes potencialmente candidatos aos DDSs selecionamos inicialmente membros afetados (e seus parentes disponíveis) de duas famílias não aparentadas portadoras de SRTE.

O sequenciamento dos exomas foi realizado na plataforma HiSeq2500 da empresa Illumina na configuração *paired-end* que permite sequenciar o DNA genômico com alta qualidade a partir da região terminal dos fragmentos. Bibliotecas foram construídas a partir do DNA genômico disponível dos membros afetados e não afetados das duas famílias não aparentadas (F1 e F2), de acordo com o protocolo do *kit Nextera Exome Enrichment* (cat. FC-121-1204; Illumina, EUA). Foram estudados: (a) 2 irmãos portadores de síndrome de regressão testicular embrionária (SRTE), o pai e a mãe não afetados; (b) Paciente índice e o sobrinho portadores de SRTE e a sua irmã não afetada (mãe do sobrinho) (Figura 3). Etapas do preparo para o SEPLE foram descritas resumidamente a seguir (Figura 4).

Figura 4 - Etapas do SEPLE realizado pelo *kit* Nextera Enrichment DNA (Illumina).

O DNA genômico foi submetido inicialmente à fragmentação enzimática resultando em fragmentos com tamanhos variáveis entre 150-350 pares de bases. Durante este processo, foram selecionados amplicons através de sondas específicas. Estes amplicons foram pré-estabelecidos pelo fabricante e correspondem a regiões codificadoras, regiões das junções exon-intron (constituídas por sequências com menos de 150 pares de bases) que poderiam alterar sítios de *splicing*, regiões promotoras, regiões alvos de RNA não codificadores e também as regiões 3'UTR e 5'UTR (*untranslated regions*). As sequências adaptadoras e sequências barcode (“etiquetas” que facilitariam a identificação de um único paciente dentro de uma mistura de bibliotecas de DNAs) foram incorporadas às extremidades de cada fragmento. As sequências adaptadoras permitem a hibridação e a amplificação dos fragmentos dentro da célula de fluxo durante o processo de sequenciamento. Na reação de sequenciamento do exoma das amostras foi utilizado 50 ng do DNA dos pacientes deste estudo foram realizadas no Laboratório de Sequenciamento da ESALQ-USP, cujo responsável é o Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho.

As análises por instrumentos de bioinformática dos dados obtidos no sequenciamento do exoma das amostras dos membros das duas famílias portadoras de SRTE foram executadas pelo Dr. Antonio Marcondes Lerário.

Preparação dos arquivos brutos para análise das variantes

As análises por instrumentos de bioinformática dos dados obtidos no sequenciamento do exoma das amostras dos membros das duas famílias foram executadas pelo Dr. Antonio Marcondes Lerário. Esta análise consistiu no alinhamento dos dados brutos (arquivos FASTQ; <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), estes foram alinhados ao genoma referência hg19/GRCh37 através do software BWA (*Burrows-Wheeler Aligner*, <http://bio-bwa.sourceforge.net>) (47). Posteriormente, foi realizada a ordenação de acordo com as coordenadas genômicas e a marcação dos fragmentos duplicados, através do software biobambam2 (48).

Os arquivos BAM (duplicata do arquivo SAM, *single alignment multiple*) resultantes foram submetidos ao realinhamento local ao redor de *indels* (deleções e inserções) e à recalibração dos escores de qualidade através de ferramentas específicas do *Genome Analysis Toolkit* (GATK, <http://www.broadinstitute.org/gatk/>). Todas as amostras passaram no controle de qualidade, com média de 92,06% de bases sequenciadas com cobertura mínima de 5X. A média de qualidade de mapeamento foi maior do que 40X.

As variantes discordantes da sequencia-referência, a qual resulta na geração de arquivo VCF (Variant Call Format), foram identificadas através da ferramenta Unified Genotyper do programa GATK. Este arquivo contém uma listagem (por amostra) de todos os pontos em que há divergência em relação ao genoma-referência. Após a filtragem e a identificação das variantes com baixos escores de qualidade, são realizadas múltiplas análises através do programa ANNOVAR (informações atualizadas sobre esse programa estão disponíveis no site <http://annovar.openbioinformatics.org/en/latest/>; (49) que incluem: 1) a localização da alteração nucleotídica em relação à sua posição no gene, bem como seu efeito na proteína, no caso de alterações em regiões codificadoras; e 2) os dados referentes à frequência da alteração nucleotídica em bancos de dados populacionais e em bancos de dados de variantes alélicas com significado clínico foram avaliados.

Etapas da filtragem das variantes a partir do arquivo VCF

As etapas de filtrações das variantes a partir do arquivo VCF foram as seguintes:

- a) Na primeira etapa da filtração levamos em consideração a segregação familiar. Nas famílias com mais de um indivíduo sequenciado, o cenário de segregação mais provável foi escolhido para execução, seguido das demais ocasiões em ordem de probabilidade. Por exemplo, para dois irmãos afetados, filhos de pais não afetados, não consanguíneos, foi feita a comparação direta de variantes em heterozigose composta (duas variantes heterozigotas em um mesmo gene), em seguida a comparação direta de variantes em homozigose (menos provável devido à não consanguinidade dos pais da família 1), e finalmente a comparação direta de variantes em heterozigose simples (apenas uma variante heterozigota por gene; uma situação ainda menos provável porque pressupõe mosaicismo germinativo, considerando pais não afetados);
 - b) Em seguida, foram eliminadas variantes em regiões intergênicas, intrônicas sem impacto em *splicing* (variantes que não levam alteração no sítio de *splicing* alternativo), não traduzidas (3'UTR e 5'UTR), alvos de RNAs não codificantes e downstream;
 - c) Na próxima etapa consistia na filtração de variantes com frequência alélica mínima maior que 0,5%, usando a integração da solução de filtração com os bancos de dados populacionais: 1000 Genomes (<http://www.1000genomes.org/ensembl-browser>), dbSNP (Short Genetic Variations, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), além dos bancos de exomas ESP6500 (Exome Sequencing Project, <https://esp.gs.washington.edu>) e ExAC Browser (Exome Aggregation Consorsitum, <http://exac.broadinstitute.org/>).
 - d) As variantes não sinônimas foram filtradas utilizando os programas Mutation Taster (disponível no site: <http://www.mutationtaster.org>), Mutation Assessor (disponível no site: <http://mutationassessor.org/r3/>), SIFT (disponível no site: <http://sift.jcvi.org>), Polyph2 (disponível no site: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), CADD (disponível no site: <http://cadd.gs.washington.edu/score>) e GERP++ (disponível no site: <http://mendel.stanford.edu/SidowLab/downloads/gerp/>) e entre outros.
-

- e) Variantes com conta alélica (AC, allele count) mínima menor que 6 e a frequência alélica (AF, allelic frequency) mínima menor que 0,5 foram mantidas pelas filtragens; consideramos apenas as variantes dentro de uma quantidade de pacientes analisados e da raridade da doença.
- f) As variantes alélicas encontradas foram classificadas em cinco categorias principais: patogênicas, provavelmente patogênicas, variantes de significância clínica incerta (VSCI), provavelmente benignas e benignas de acordo com as diretrizes do American College of Medical Genetics and Genomics (50,51).

Bancos de dados populacionais adicionais

Cento e sessenta e oito pacientes Brasileiros com diferentes doenças do nosso banco de dados SELA (financiado pela FAPESP – número do projeto temático 2013/02162-8) e 609 indivíduos saudáveis do Arquivo Brasileiro Online de Mutações (ABraOM, disponível no site <http://abraom.ib.usp.br>) foram utilizados para o estudo da frequência alélica das variantes candidatas à SRTE. Os indivíduos registrados no banco de dado populacional gnomAD (*Genome Aggregation Database*, disponível no site <http://gnomad.broadinstitute.org/about>) também foram utilizados como indivíduos controles neste estudo.

4.4.3 Desenho e sequenciamento do painel customizado de genes envolvidos em DDS.

O painel customizado de genes-alvo associados ao DDS para SEPLE. Este painel, foi elaborado a partir da ferramenta AgilentSureDesign 2.0 (Agilent Technologies, EUA) e realizado pela plataforma Illumina (Illumina, Inc, San Diego, CA, EUA). Essa ferramenta desenha sondas específicas para seleção e captura das regiões genômicas de interesse (Tabela 3). A análise etiológica molecular dos casos esporádicos foi inicialmente realizada por Sanger, e esta técnica foi substituída após a introdução do uso do painel customizado na rotina do laboratório.

Tabela 3 – Listas dos 62 genes que foram estudados no painel customizado para DDS.

Genes envolvidos na determinação gonadal

AMH	DMRT2	LHX1	FOXL2	SOX9	PBX1	WWOX
CBX2	FGF9	MAMLD1	NANOS3	SRY	AXIN1	
CITED2	FGFR2	MAP3K1	PTDGS	STAG3	PAX2	
DHH	GATA4	NR0B1	RSPO1	WNT4	NANOS2	
DHX37	GSK3B	NR5A1	RSPO2	WXT1	TCF21	
DMRT1	GDF9	BMP15	SOX3	ZFPM2	TES	
Genes envolvidos na síntese hormonal						
AKR1C2	AKR1C3	AKR1C4	CYP17A1	CYP19A1	HSD11B1	HSD17B3
HSD3B2	POR	SRD5A2	STAR	RAC1	CYP21A2	
Genes envolvidos com receptores hormonais						
AMHR2	ESR2	FSHR	LHCGR	ESR1		
Genes envolvidos com malformações genitais síndrômicas						
ARX	ATRX	DHCR7	HNF1B	CDH7		

4.4.4 Amplificação de DNA genômico por reação de polimerização em cadeia (PCR)

Para confirmar a presença da variante c.923C>T (p.Arg308Gln) no gene *DHX37* identificada por SEPLE e associada ao quadro clínico dos membros afetados das duas famílias estudadas foi utilizada a técnica de sequenciamento por Sanger. Esta mesma técnica foi utilizada na investigação dos outros pacientes portadores de DDS 46,XY incluídos no estudo.

Vinte oligonucleotídeos diretos e reversos, flanqueando a região promotora e as regiões codificadoras do *DHX37* (ENST00000308736, disponível no site www.ensembl.org/index.html) foram desenhados utilizando o sistema *Primer3* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/>) assim como dois oligonucleotídeos para o exon 6 do *GATA4* (ENST00000528712). Os oligonucleotídeos utilizados estão descritos na Tabela 4 e os protocolos das PCRs para as amplificações do DNA para ambos os genes, *GATA4* e *DHX37*, nas tabelas 5 e 6 respectivamente.

Tabela 4 - Sequências de oligonucleotídeos específicos para amplificação dos 27 exons do *DHX37* e para o exon 6 do *GATA4*.

Exon	Oligonucleotídeos 5' – 3'		Tamanho do gmento (pb)
	Sense (F)	Antisense (R)	
<i>DHX37</i>			
1	ACA CAA CCC GGA AGT CTC AC	CCA CCC GAG AGT CCT GAA G	299
2	AGA TCC CCC TGT TCC TGT GT	GAC ACC CTC AGG AGG AGA GA	370
3	CGC CGA TTT TAA AGA CTC CA	CAA TGA ATT TTC AGC CAC TCA	367
4	CTG AGG CAG AAA GGG GTA TG	ACA TGG AGG CAC AGA GAA GG	546
5	CAT CTG TTC AGC ACC CAT GT	TGA AGT CAC ACA GCA TGC AC	377
6	GTG GAA CTG CAT GAG GCT TT	CAC CTC CTC CTG GGC TTC	247
7	ACG GCC TGC CTT GTA GTG	TGC TCA TAT CCC AGG TGA CA	258
8	TCC TCA AGT GGG AGT TCT GG	GTA CAA CGG GGA ACA GGT GA	292

9-10	CAT CCA GAA AGG GGC AGA G	GGA CTT TTC TGA GCC ACT CG	666
11-12	ATG GCT TGG CAG GTG CTT	CAC TTA AAC CTA AGC AGC CAC A	597
13	GGC ACC TGT CTT CCT GCA C	GTG CCA GGC AGT TTC AAG A	367
14-15	AAG AAA GGA GCT CTG GTG GA	GGC AGG ACA CGG AAC ATA CT	839
16	GTC CCG GTT TCT GTC TGC	CAC CAG CAG ACC CAG CTC	291
17-18	AGA GAG GGG TTG GAG GGA GT	CAA CCT CTA CCT CCT GGG TTC	668
19-20	GAG CCT GTC CCG ATG AAT AA	TGC AAA CGT GGA CTC TAT GG	521
21	CTG AGC ATG GTT GGG ACT TT	ACA GCT GAG AGG GAA CAA GC	366
22-25	TCA GAT TCT TCT CCT GGG TTG	TGT GTG TGG TGC TTT GTC CT	995
26-27	GAT GCC TGC CCT GCT TTC	GCT TGA CCC ACT TCC TGA GA	589
GATA4			
6	CCC CGG CAA ATG TAG ATA AA	GCA AGC AGT GAG CTA CCC TC	393

O protocolo de PCR para as foi realizado no volume total de 25µl com um mix de reação contendo 200–500 ng DNA genômico, 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 10 pmol cada oligonucleotídeo, 5x de PCR buffer e 1.25 U de Go Taq DNA polymerase (Promega, EUA). Para a amplificação do exon 13 do *DHX37* foi adicionado ao mix de amplificação, anteriormente descrito, 5 M de betaína (Invitrogen, EUA) e para a amplificação dos exons 17-18 foi adicionado 0.625 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems, EUA). As amostras foram amplificadas de acordo com os protocolos descritos nas tabelas abaixo:

Tabela 5 - Protocolo de amplificação para os 27 éxons do gene *DHX37*.

Temperatura	Tempo	Número de ciclos
95°C	5 min	x 1
95°C	30 s	x 35
60 °C	30s	
72°C	30s	
72°C	10 min	x 1
15°C	∞	

Tabela 6 - Protocolo de amplificação para o éxon 6 do *GATA4*.

Temperatura	Tempo	Número de ciclos
96°C	5 min	x 1
96°C	45 sec	x 35
60°C	45s	

72°C	45s	
72°C	10 min	x 1
15°C	∞	

O produto amplificado foi quantificado através de uma eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, EUA) a 1% em TAE (0,004 M Tris, ácido acético glacial, 0,001 M EDTA, pH 8) contendo SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, EUA) na concentração de 0,8 µg/mL de gel, utilizando-se como padrão de massa 500 ng do marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen, EUA).

4.4.5 Sequenciamento automático direto (método de Sanger)

Para o sequenciamento, foi aproximadamente 30 ng do produto amplificado para a uma reação de purificação enzimática com 10 U da enzima exonuclease (*ExoSAP-IT*, GE Healthcare Life Sciences, EUA) durante 15 minutos a uma temperatura de 37°C, seguida por 15 minutos a 80°C para inativação da enzima. Após a purificação, o material foi submetido a uma reação de sequenciamento utilizando o *kit ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, EUA). Utilizou-se 20 ng do produto purificado, 1 µL de *ABI Fsm BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*, 1 µL de tampão de sequenciamento e 5 pmol de um dos oligonucleotídeos específicos para cada exon que foram submetidos a um protocolo no termociclador (modelo 9700, Applied Biosystems, EUA) com 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por cinco segundos e 60°C por quatro minutos.

O produto da reação de sequenciamento foi transferido para uma placa de 96 poços (MicroAmp optical 96-well Reaction Plate, Applied Biosystems, EUA) e precipitado de acordo com o protocolo de isopropanol/etanol (Applied Biosystems, EUA). Após o acréscimo de 15 µL de formamida (Formamida Hi-Di, Applied Biosystems, EUA) em cada poço da placa, esse produto foi submetido a uma eletroforese capilar no sequenciador automático *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, EUA). A análise foi realizada pelo programa *3130 XL Sequencing Analysis* (Applied Biosystems, EUA).

4.4.6 Análise do efeito fundador nas famílias 1 e 2 com a variante p.Arg308Gln

Para o estudo do efeito fundador da variante (p.Arg308Gln) no gene *DHX37* encontrada nas duas famílias não aparentadas, vinte e nove marcadores (polimorfismos localizados a uma distancia de -3111 a 7236 kb) situados no braço longo do cromossomo 12 foram selecionados a partir dos dados gerados pelo SEPLE. Para análise dos marcadores foi utilizado o programa *Beagle* (disponível no site: <http://faculty.washington.edu/browning/beagle/beagle.html>) pelo bioinformata Dr. Antonio Marcondes Lerário.

4.4.7 Análise de interação de proteína por ferramentas de bioinformática

Para avaliarmos as interações do gene *DHX37* e genes envolvidos na cascata do desenvolvimento gonadal, nós utilizamos o site NCBI (disponível no site: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As redes de interações de proteínas foram geradas a partir dos sites Biogrid e String (disponíveis nos sites: <https://thebiogrid.org> e <https://string-db.org>, respectivamente).

Com base nestas evidências, sugerimos um novo modelo da via de determinação gonadal com a participação do *DHX37* que será confirmado através de um estudo *in vitro* baseado nos experimentos propostos por Loke *et al* (10).

4.4.8 Análise estatística

A distribuição genotípica e a frequência alélica entre pacientes com DG 46,XY/SRTE e o grupo controle foram avaliadas em tabelas de contingência, pelo teste Qui-quadrado². Para a análise de dados, foi utilizado o programa *SigmaStat* v2.03 (SPSS, Inc., EUA).

4.4.9 Análise do padrão de metilação da região promotora do gene *DHX37*

Para avaliar a condição de variabilidade da expressão fenotípica da variante p.Arg308Gln no gene *DHX37* identificada nos membros da Família 1, pai carreador assintomático da variante e filhos afetados, que sugere a presença de um padrão de herança autossômica com penetrancia incompleta realizamos a análise do padrão de

metilação de ilhas CpG presente na região promotora do *DHX37*. Essa análise foi realizada em amostras de DNA de membros afetados e não afetados da família 1 e 2, portadores da variante p.Arg308Gln no *DHX37*, e comparados a amostras de indivíduos controles (feminino e masculino) pareados para a faixa etária (idade média de 30.2 anos) (52).

Neste estudo foi utilizado o kit *Infinium Methylation EPIC BeadChip 850K* (Illumina, EUA) e realizado de acordo com as instruções do fabricante. As diferentes etapas do ensaio estão esquematizadas (Figura 5).

Figura 5- Etapas do estudo de metilação segundo o protocolo do *kit* Infinium Methylation EPIC BeadChip 850K (Illumina).

O BeadChip 850K contém sondas de 50 pares de bases cobrindo mais de 850.000 sítios CpGs localizados nas regiões enhancer identificadas pelos projetos ENCODE (53,54) e FANTOM5 (55). As sondas foram distribuídas sobre a região promotora (TSS200 e TSS1500), 5' UTR, primeiro éxon, corpo gênico, 3' UTR e intergênica (56).

Brevemente, duzentos e cinquenta nanogramas de DNA foram tratados com bisulfito de sódio, para converter as citosinas não metiladas em uracila, fragmentados por ação enzimática e amplificados pela reação da polimerase dentro da célula de fluxo (*flowcell*) no equipamento iScan (Illumina, EUA). Este estudo e análise dos dados foram realizados pelo Laboratório de Citogenética do HCFMUSP (LIM03), cuja responsável é a Dra. Leslie Domenici Kulikowski.

No beadchip existem sondas diferentemente desenhadas e distribuídas em duas partes: Infinium I e II. No Infinium I, consiste de duas sondas (metilada e não metilada) por *locus* para sítios CpG foram distribuídas ao longo do DNA genômico (16,2%). E no Infinium II, uma sonda por *locus* para sítios CpG foi distribuída em regiões com baixa intensidade (83.8%) (56,57).

4.4.9.1 Normalização e pré-processamento dos dados obtidos

Os dados gerados a partir do escaneamento do beadchip foram normalizados e pré-processados, incluindo a comparação das diferentes sondas (Infinium I e II), que cobrem as ilhas CpGs distribuídas em todo o DNA genômico e o nivelamento das intensidades dos sinais diferentes entre as sondas Infinium I e II (58). Os detalhes da execução desta análise estão descritos em figura 5. As análises de bioinformática foram realizadas pelo Dr. Julian Gabriel Damasceno.

Os dados brutos foram passados pelo controle de qualidade e normalização usando os protocolos *standard* sugeridos pelo biocondutor pacote R (*R Studio*, *BMIQ* e o *LIMMA*) para a obtenção dos valores beta a partir dos resultados do estudo do estado de metilação do DNA genômico (59). Brevemente, todas as sondas contendo polimorfismos com uma frequência alélica menor $\geq 0,01$ a cada 10 pares de bases (que poderiam nos trazer informações incorretas sobre a região metilada) e reações cruzadas foram removidas da análise (intensidades de sinais diferentes entre as sondas presentes nos Infinium I e II) utilizando o programa *R Studio*, conforme as instruções de Chen e colaboradores (58). A partir dos pacotes *watermelon*, *methyumi* e *BMIQ* (*beta-mixture quantile*) foi possível calcular a média, mediana e a Tukey's Biweight robust average das metilações presentes nas regiões de 5' UTR, primeiro éxon, corpo gênico e 3' UTR. O pacote *LIMMA* permitiu gerar uma lista de genes mais relevantes (*top_ranked_gene*) significantes com o valor de $p < 0,05$. Todos os dados relevantes foram possíveis de ser visualizados pelo pacote *HeatPlus* version 2.2.2 (60). O procedimento das filtrações foi realizado pelo bioinformata Dr. Julian Gabriel Damasceno.

Os dados da análise do estado de metilação genica realizado neste estudo foram normalizados e pré-processados (Figura 6), resultando uma lista de genes com alteração no estado de metilação.

Figure 6 - Densidade da intensidade da metilação distribuída em valores beta (de 0 a 1) entre afetado e normal (não afetado). Qualidade da análise dos dados de metilação antes (A) e depois (B) da normalização.

4.4.9.2 Classificação do estado de metilação

Classificamos o estado de metilação gênica a partir da distribuição consistente do valor beta pelo pacote BMIQ, sendo que número próximo de 0 indica sítio de CpG hipometilado e próximo de 1 indica sítio de CpG hipermetilado (61).

4.5 Análises histológica e imunohistoquímica.

4.5.1 Histologia

As lâminas contendo fragmentos do tecido gonadal dos pacientes com variantes alélicas identificadas no gene *DHX37*, recuperadas no arquivo do Departamento de Patologia do HC FMUSP foram revisadas para por um único médico patologista com reconhecida experiência em doenças gonadais, a Profa Dra Filomena Marino Carvalho.

Para os estudos histológico e imunohistoquímica utilizamos oito amostras de tecidos testiculares, obtidos em necropsias de indivíduos sem anormalidades do desenvolvimento sexual e com diferentes idades cronológicas (recém nascidos de 27 e 33 semanas gestacionais, recém nascidos com 1 dia, 53 e 180 dias de vida, adultos com 13, 23 e 53 anos foram também realizados.

Os cortes histológicos das gônadas de pacientes e controles corados pela hematoxilina-eosina foram avaliados qualitativamente quanto às seguintes características, com critérios modificados para este estudo de McLachlan e colaboradores (62).

1. Tipo de gônada: Testículo de tipo adulto ou testículo de tipo infantil.

2. Homogeneidade vs. heterogeneidade da histologia.
3. Espessamento da membrana basal dos túbulos seminíferos (ausente, discreto, moderado ou intenso).
4. Presença ou ausência de fibrose nos túbulos:
 - Definição de hialinização de túbulo seminífero: fibrose do túbulo com ausência de células de Sertoli e células germinativas.
5. Diâmetro dos túbulos seminíferos: habitual para o tipo de testículo, reduzido ou dilatado.
6. Densidade do epitélio germinativo dos túbulos: afilamento com presença de lúmen ou preservada.
7. Avaliação da população celular nos túbulos:
 - a. Sertoli;
 - b. Células germinativas: espermatogônias, espermatócitos, espermátides (espermatogênese) e espermatozoides (espermio gênese);
 - c. Hipoespermatogênese:
 - Redução leve, moderada ou intensa de células germinativas;
 - Espermatogênese até espermátides menores, de núcleos condensados e alongadas;
 - e parada de maturação: definida pela não progressão a partir do estágio visualizado em nenhum ducto da amostra.
8. Tecido intertubular: presença de células de Leydig, formação de agregados nodulares.

4.5.2 Imunohistoquímica com o anti-DHX37

As amostras de tecidos testiculares controles de indivíduos de diferentes idades cronológicas (recém nascido pré-termo, recém nascidos e adultos) foram submetidas a técnica de imunohistoquímica utilizando anticorpos anti-DHX37 (NB110-40581; Novus Biological, EUA) e a sua revelação com o NovoLink Polymer Detection Systems (Leica Biosystems, Reino Unido) (Tabela 7 e Figura 7). Os procedimentos seguidos para a realização da técnica de imunohistoquímica foram realizados pelo Laboratório de Imunohistoquímica do Departamento de Patologia da FMUSP (protocolo disponível no Anexo B).

Tabela 7 - Titulação e fonte do anticorpo primário utilizado no estudo imunohistoquímico da proteína DHX37 nos diferentes tecidos testiculares humanos.

Anticorpo	Titulação	Tipo de testículo	Idade dos indivíduos
DHX37	1:50	Prepúbere	27 semanas durante a gestação a 180 dias pós gestação 6 meses pós natal
DHX37	1:50	Púbere	13 anos
DHX37	1:50	Adulto	23 e 54 anos

A intensidade de coloração não foi considerada pela possível influência das condições técnicas, já que o material foi colhido e processado em datas e condições diferentes.

Figura 7 - Imagem de microscopia de luz de corte histológico de testículo adulto com células marcadas pelo DHX37 localizadas dentro dos túbulos seminíferos. Imagem do tecido com o aumento de 100X.

Os resultados gerados pela imunohistoquímica do presente estudo foram comparados com os dados do *The Protein Human Atlas* (disponível no site: www.protein.org).

5. Resultados

5. Resultados

5.1 Pacientes com SRTE familiar estudados por SEPLE

O SEPLE foi realizado em 6 membros de duas famílias não aparentadas (F1 e F2) com diagnóstico de SRTE e resultou no total de 214.949 variantes alélicas identificadas em heterozigose na família 1 e de 183.174 variantes na família 2 (Figura 8), com uma cobertura horizontal média de 99% e de uma profundidade de leitura de no mínimo 5X em cada corrida e, com a qualidade de mapeamento de no mínimo 40X.

Na filtragem dessas variantes alélicas, foram adotados critérios rigorosos para selecionar as variantes provavelmente causadoras do fenótipo SRTE. A variante alélica c.923C>T (g.13647C>T; na posição cromossômica 12:125460022 no GRCh37) em heterozigose no *DHX37* (DEAH [Asp-Glu-Ala-His] *Box Polypeptide 37*) foi a única comum presente nas duas famílias não aparentadas (Figuras 8) entre genes (327 da Família 1 e 341 da Família 2) que restaram ao final de toda filtragem.

Família 1 (Filhos afetados e pais não afetados)	Família 2 (Tio e sobrinho afetados)
214.949	183.174
HETEROZIGOTO	
43.557	33.016
Excluídas variantes presentes em regiões não transcritas, <i>splicing</i> alternativo ou promotora (intrônica, intergênicas, alvos de RNAs não codificantes e <i>downstream</i>)	
9.113	7.154
Excluídas variantes com MAF > 0,5% em bancos de dados populacionais (ESP6500, 1000G ExAC e dbSNP)	
327	341
Variante comum no gene DHX37	

Figura 8 - Filtragem das variantes alélicas identificadas pelo SEPLE de duas famílias com SRTE estudadas.

Nenhuma variante potencialmente deletéria em homozigoto (família 1 com possível herança recessiva) ou em heterozigose composto (famílias 1 e 2 analisadas) foi identificada.

A investigação em regiões intergênicas, na região promotora, no 3' UTR ou em outros genes presentes no *locus* 12q24.31 previamente associados à hipospádia ou

criptorquidismo (63) revelou a ausência de alterações patogênicas relevantes à causa de SRTE nas famílias estudadas.

Figura 9 – Arquivos do múltiplo alinhamento de sequências gerados pelo IGV (*Interactive Genomic Viewer*) dos DNAs amplificados dos membros das duas famílias estudadas por SEPLE. Observa-se a presença (barras horizontais vermelha e azul) da variante c.923C>T (p.Arg308Gln) no gene *DHX37* em heterozigose (indicada pela letra “T” com cor vermelha) nos indivíduos III.2, III.3 e II.3 da Família 1 e indivíduos II.4 e III.1 da Família 2 e ausência desta variante no indivíduo II.4 da família 1.

Esta variante alélica *missense* está presente em 3 transcritos diferentes: c.923C>T no ENST00000308736 (NM_032656, 4550 pares de base [pb], cDNA.1022C>T; p.Arg308Gln está na região que codifica proteína de 1157 aminoácidos [aa], NP_116045), no ENST00000544745 (4116pb, c.284C>T, cDNA.394C>T; p.Arg95Gln está na região que codifica proteína de 962 aa) e no ENST00000543962 (669 pb, cDNA.1022C>T; região codificada proteína de 133 aa).

5.1.1 Identificação de um novo gene candidato: gene *DHX37*

O gene *DHX37* (DEAH [Asp-Glu-Ala-His] Box Polypeptide 37 OMIM*617362), localizado no braço longo do cromossomo 12, pertence à superfamília 2 (SF2 DEAH Box) da família das RNA helicases, as quais codificam proteínas que possuem uma região muito conservada de quatro aminoácidos (DEAH - Asparato-

Glutamato-Alanina-Histamina). Proteínas com DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box são RNA *helicases*, que participam de vários processos celulares envolvidos na alteração da estrutura secundária do RNA, como a iniciação da tradução, *splicing* alternativo mitocondrial ou nuclear e biogênese ribossômico. O grupo SF2 DEAH box está envolvido nos processos de divisão e crescimento celular, embriogênese e espermatogênese (informação disponível no site: <http://www.rnahelicase.org>).

Este gene participa dos processos biológicos da neurogênese, processamento do RNA ribossômico, regulação positiva do RNA mensageiro nuclear. A proteína DHX37 está expressa em diferentes tecidos, incluindo o testículo (*The Protein Human Atlas*).

5.1.2 Confirmação da variante c.923C>T (p.Arg308Gln) pelo método de Sanger

Os dados do SEPLE e o método Sanger, foram confrontados e confirmam a presença da variante alélica c.923C>T (p.Arg308Gln) localizada no éxon 6 do *DHX37* nos membros afetados e de um membro não afetados de ambas as famílias não aparentadas (Figura 10).

Figura 10 - Eletroferograma com a variante c.923C>T (p.Arg308Gln) em heterozigose na fita reversa do *DHX37* em membros das duas famílias portadoras de SRTE.

A análise de segregação familiar das duas famílias com a mesma variante alélica no gene *DHX37* identificada por SEPLE (Figuras 10 e 11) revelou:

Na família 1, na qual o alelo com a variante foi transmitido pelo o pai, carreador assintomático da mesma variante presente nos filhos afetados; a mãe não apresentava a variante alélica sugerindo um padrão de herança autossômico dominante ligada ao sexo com penetrância incompleta.

Na família 2, a segregação familiar demonstrou que o alelo com a variante foi transmitido pela mãe carreadora assintomática da mesma variante presente no seu filho afetado e no seu irmão afetado. O pai não estava disponível para estudo genético. O padrão de herança sugerido é o autossômico dominante ligado ao sexo.

Figure 11 - Heredogramas das duas famílias não aparentadas portadoras de SRTE familiar com a variante c.923C>T (p.Arg308Gln) no *DHX37*. Pacientes índices são indicados pela seta preta. Todos os afetados estão representados pelo quadrado preenchido de cor preta (F1. III2 e III3; F2.II4), e o símbolo quadrado contendo um círculo não preenchido (F2.III2) representa o paciente com cariótipo 46,XY com mudança do sexo de registro masculino para o sexo feminino. Símbolos: +/- variante em heterozigose, -/- variante ausente ND: DNA não disponível.* membros incluídos no estudo e investigados pelo método de Sanger.

5.1.3 Descrição fenotípica dos pacientes de SRTE familiar

Família 1 (F1): Os dois irmãos (F1.III2 e .III3) com SRTE pertencem a uma família não consanguínea do estado de Mato Grosso do Sul (Dourados) do Brasil (Figura 11). Os pais (F1.III3 e .III4) dos pacientes são assintomáticos e não apresentavam antecedentes mórbidos. A meia-irmã (F1.III1) assintomática não foi avaliada fisicamente. O DNA dos avós paternos (F1.I1 e .I2) não estava disponível para a análise molecular.

Paciente F1.III2 (Índice): Paciente encaminhado para avaliação por genitália atípica aos 2,2 anos. Gestação e parto sem intercorrências. O exame genital mostrava: micropênis (tamanho do pênis de 1,5 centímetro de comprimento; < -2,5 DP), meato uretral glandar e gônadas não palpáveis. O estudo citogenético convencional revelou cariótipo 46, XY. O teste de estímulo crônico com gonadotrofina coriônica humana (hCG) realizado com 1 ano e 8 meses mostrou ausência de incremento nos valores de testosterona. A ressonância magnética de pelve não identificou a presença de útero, mas uma pequena estrutura sugestiva de gônada foi observada na região inguinal esquerda. Na laparotomia exploradora foi realizado exérese de gônadas bilaterais e não se identificou a presença de útero. No estudo histopatológico epidídimo, ductos wolffianos, réte testis e tuba uterina de padrão atrófico foram identificados bilateralmente. Na gônada direita observou-se estroma de tipo ovariano em localização

superficial, junto à rete testis (0,4 X 0,2 mm), correspondente a padrão de gônada disgenética e outra área focal (0,7 X 0,3 mm) de tecido com calcificações e artefatos térmicos, que pode corresponder a área de regressão de tecido testicular (Figura 12A). À esquerda, junto à rete testis, observa-se área de colagenização ricamente vascularizada (1,8 X 1,1 mm), sugestiva de tecido gonadal com regressão total. Adjacente a esta área, em localizado superficialmente observou-se um estroma fibroso (1,0 X 0,4 mm) (Figura 12B).

Figura 12 - Cortes histológicos do tecido gonadal do paciente F1.III2 (aumento 100X, coloração HE). RT: rede testis; GD: gônada direita; GE: gônada esquerda.

Paciente F1.III3: Irmão do paciente índice F1.III3. Paciente foi avaliado com 1,3 anos por genitália atípica. Mãe relatava uma gestação sem intercorrências, porém na avaliação ultrassonográfica fetal a criança foi identificada inicialmente como do sexo feminino, e posterior identificação de genitália ambígua. A presença de micropênis e gônadas não palpáveis foi confirmada ao nascimento. O exame genital mostrava: micropênis (tamanho do pênis de 2,0 centímetros no comprimento; < -2,5 DP), meato uretral glandar e presença de fimose. Uma pequena estrutura (0,5 cm) foi palpada na região inguinal esquerda. O estudo citogenético convencional revelou cariótipo 46, XY. Na RM de pelve foram identificadas estruturas gonadais nos anéis inguinais internos (0,9x0,6x1,0cm e 1,0x0,5x0,9cm, respectivamente à direita e à esquerda) e útero não foi identificado. Durante a laparoscopia exploradora, um tecido gonadal atrófico foi

localizado nos anéis inguinais internos e ressecado; a presença de útero não foi observada. Postectomia foi realizada. No estudo histopatológico ducto deferente, epidídimo, rete testis e tuba uterina foram identificados bilateralmente (Figuras 13A e B). Na gônada direita observou-se, junto à rete testis, testículo (2,2 X 1,1 mm) com túbulos seminíferos exibindo difusa degeneração, com padrão de células de Sertoli com degeneração hidrópica e sem células germinativas evidentes. Não se evidenciam células de Leydig (Figura 13B e C). À esquerda, também junto à rete testis, observou-se área de colagenização (2,7 X 2,1 mm), ricamente vascularizada que sugerem tecido testicular com regressão total (Figuras 13B e C).

Figura 13 - Corte histológico da gônada direita (GD) do paciente F1.III3 (aumento 100X, coloração HE). B e C. Cortes histológicos da gônada esquerda (GE) (aumento de 100X e 200X, coloração HE). RT: rete tétis; CS: células de Sertoli; TS: túbulo seminífero.

Família 2 (F2): A segunda família não consanguínea, do interior de São Paulo (Pirapozinho), é constituída do caso índice (F2.II4) e seu sobrinho (F2.III1) portadores de SRTE (Figura 14; Tabela 8). O caso F2.II4 presença de um micropênis e gônadas não palpáveis aos 14 anos de idade (Figura 15). O seu sobrinho F2.III1 apresentou o

mesmo fenótipo com 1 ano e 8 meses. Os dois membros afetados apresentaram um baixo nível de FSH e de LH (Tabela 8). A irmã (F2.II3) do caso índice F2.II4 e mãe do paciente F2.III1 é assintomática e não apresentava antecedente mórbido. O DNA do pai do paciente F2.III1 e dos avós maternos não estava disponível para a análise molecular.

Figura 14 - Heredograma da família 2 composta por 8 membros de três gerações. Pacientes índices são indicados pela seta preta. Todos os afetados estão representados pelo quadrado preenchido de cor preta (F2.II4 e III1), e o símbolo quadrado contendo um círculo não preenchido (F2.III2) representa o paciente com cariótipo 46,XY com mudança do sexo de registro masculino para o sexo feminino. ND: DNA não disponível.

Figura 15. Aspecto da genitália externa do paciente índice F2.II4.

Paciente F2.II4: Paciente encaminhado para avaliação por genitália atípica aos 14 anos (Figura 15). Informações sobre as condições de gestação e do parto não eram conhecidas. O exame genital mostrava: micropênis (tamanho do pênis < -2,5 DP para a idade), meato uretral glandar e gônadas não palpáveis. O estudo citogenético convencional revelou cariótipo 46, XY. O teste de estímulo crônico com gonadotrofina coriônica humana (hCG) realizado aos 14 anos não mostrou incremento significativo nos valores de testosterona (os valores de T foram 12 e 29 ng/dL respectivamente no tempo basal e após hCG). Na laparotomia exploradora não foi observada a presença de gônadas e de útero. No estudo histológico não foi identificado tecido gonadal; porem a

presença de epidídimo e canal deferente normais e trompas uterinas hipoplásicas foi observada. Dados apresentados na Tabela 8.

Paciente F2.III1: Sobrinho do paciente F2.II4. Paciente avaliado por genitália atípica com 1,8 anos. Mãe relatava gestação e parto normais. O exame genital mostrou: micropênis (tamanho do pênis de 1,0 centímetro de comprimento; < -2,5 DP), meato uretral glandar e gônadas não palpadas. O estudo citogenético convencional revelou cariótipo 46, XY. No exame ultrassonográfico de pelve e região inguinal não foram identificadas a presença de derivados müllerianos e das gônadas. Durante a laparotomia exploradora um tecido gonadal atrófico localizado à direita foi identificado e ressecado, útero não foi identificado. O estudo histológico identificou a presença de tecido conjuntivo fibroso e de uma pequena área de tecido gonadal disgenético. A presença de epidídimo e canal deferente normais e trompas uterinas hipoplásicas foi observada. A troca do registro social masculino para o feminino foi realizada após avaliação psicológica da criança e dos pais (mãe) e exaustivo esclarecimento dos familiares. Dados apresentados na tabela 8.

Tabela 8- Fenótipo dos pacientes portadores de síndrome de regressão testicular embrionária (SRTE) familiar com variante alélica no *DHX37* identificada por SEPLE

Variante Alélica Estado	Família 1 c.923C>T, p.Arg308Gln Heterozigoto		Família 2 c.923C>T, p.Arg308Gln Heterozigoto	
	MS (Dourados)		SP (Pirapozinho)	
Naturalidade Paciente	F1.III2	F1.III3	F2.II4	F2.III1
Sexo de criação	Masculino	Masculino	Masculino	Masculino→Feminino
Idade cronológica na 1ª avaliação (anos)	2.2	1.8	14.0	1.8
Características sindrômicas	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes
Genitalia externa Gônadas	Masculina com Micropenis Não palpadas			
Achados histológicos no tecido gonadal	D/E-Gônada disgenética	D- Pequena área de testículo disgenético com raros túbulos seminíferos degenerados, cél germinativas ausentes, E- Ausencia de tecido gonadal	D / E - Ausencia de tecido gonadal	D –Gônada disgenética E- Ausencia de tecido gonadal
Derivados Müllerianos	Tuba uterina (+) Útero (-) Epidídimo (+)	Tuba uterina (+) Útero (-) Epidídimo (+)	Tuba uterina (+) Útero (-) Epidídimo (+)	Tuba uterina (+) Útero (-) Epidídimo (+)
Derivados Wolfianos	Ducto deferente (-)	Ducto deferente (+)	Ducto deferente (+)	Ducto deferente (+)
LH (U/L)	14.5	12	3,5*	1,9*
FSH (U/L)	117	133	87*	56*
Testosterona (ng/ml)	<30 (pós hCG)	<30 (basal)	<30 (pós hCG)	<30 (pós hCG)
Valores normais	IFME*	Crianças pré púberes LH 0,6-1,3*	FSH 1,0-3,1*	
		Adultos 1,4-9,2*	1,0-12*	
	RIE	Crianças pré púberes 1,0-10	1,0-10	Testo (b) <30 (pós hCG) 391±129
		Adultos 1,0-10	1,0-10	(b) 441-925 (pos-hCG) 1306±129

(pós hCG)- valor de testosterona sérica após estímulo com gonadotrofina coriônica humana, (b)- valor de testosterona sérica basal; (+)- presente, (-)- ausente.

5.2 Pacientes com SRTE e disgenesia gonadal 46,XY esporádicas estudados por método de Sanger

A identificação do gene *DHX37* como um potencial gene candidato à etiologia dos DDS 46,XY associados a anormalidades do desenvolvimento gonadal motivou a ampliação do estudo deste gene em uma coorte de 35 pacientes portadores de SRTE esporádico (n=6) e disgenesia gonadal 46,XY (n=29) utilizando os métodos de Sanger ou sequenciamento de larga escala por painel customizado de genes. Os pacientes com variantes alélicas do *DHX37* identificadas por Sanger foram reestudados por sequenciamento em larga escala por painel customizado de genes para avaliação da presença de variantes alélicas deletérias em outros genes conhecidos envolvidos no desenvolvimento sexual.

5.2.1 Variante alélica missense c.923C>T (p.Arg308Gln) no gene *DHX37*

A variante c.923C>T, p.Arg308Gln localizada no éxon 6 do *DHX37* foi identificada em heterozigose em um paciente portador de SRTE esporádico (CE1.II1), oriundo de São Paulo, utilizando o método de Sanger (Figura 16A).

Figura 16 - Eletroferograma (A) e heredograma (B) do paciente (CE1.II1) portador de SRTE esporádico. A) variante c.923C>T (p.Arg308Gln) em heterozigose na fita reversa do gene *DHX37* presente no paciente índice e ausente no controle. B) paciente afetado é indicado pela seta preta e o quadrado contendo um círculo não preenchido representa o paciente com cariótipo 46,XY com mudança do sexo de registro masculino para o sexo feminino. símbolo: +/- significa variante alélica identificada em heterozigose ND: DNA não disponível.

A análise de segregação na Família 3 não foi realizada devido a perda de seguimento do paciente e indisponibilidade do DNA dos membros da família para o estudo devido a interrupção do acompanhamento clínico pelo próprio paciente (Figura 16B). As análises de predição *in silico* revelaram que esta variante causa um efeito deletério na proteína de acordo com os programas: Mutation Taster, Mutation Assessor, SIFT, Polyphen-2, CADD e GERP++ (Anexo C, Tabela 9).

5.2.1.1 Descrição fenotípica do paciente CE1.III1

Paciente encaminhada para avaliação por genitália atípica aos 30 anos de idade. Paciente registrada no sexo social masculino porem com identidade e papel social feminino desde a infância. O exame genital mostrava: micropênis (tamanho do pênis de 3,5 cm de comprimento; < -2,5 DP), meato uretral glandar e gônadas não palpadas. O estudo citogenético convencional revelou cariótipo 46, XY. O teste de estímulo crônico com gonadotrofina coriônica humana (hCG) realizado com 30 anos de idade mostrou ausência de incremento nos valores de testosterona e seus precursores hormonais. No ultrassom pélvico não foi identificada a presença de gônadas ou útero. Genitoplastia feminizante foi realizada. Na laparoscopia exploradora tecido gonadal fibroso foi removido e útero não foi identificado. Tecido gonadal não foi identificado no estudo histopatológico (material não disponível para revisão) e epidídimo e tuba uterina foram identificados bilateralmente. Dados apresentados na Tabela 10.

5.2.2 Variante alélica missense c.451G>A (p.Arg151Trp) no gene *DHX37*

A variante missense c.451G>A, p.Arg151Trp; (rs577400960) localizada no éxon 4 do *DHX37* foi identificada em homozigose em um paciente portador de ETRS esporádico (CE2.II3), oriundo de Pernambuco (Buique). O paciente e sua mãe foram estudados pelo método de Sanger (Figura 17A).

Figura 17 - Eletroferograma (A) e heredograma (B) do paciente (CE2.II3) portador de SRTE esporádico. A) variante c451G>A (p.Arg151Trp) em homozigose no *DHX37* presente no paciente índice e na mãe (I.2, em heterozigose) e ausente no controle. B) paciente afetado é indicado pela seta preta e o quadrado contendo um círculo não preenchido representa o paciente com cariótipo 46,XY com mudança do sexo de registro masculino para o sexo feminino. símbolo: triângulo vazio e cortado representa natimorto, ++ significa variante alélica identificada em homozigose, +/- significa variante alélica identificada em heterozigose. ND: DNA não disponível.

O estudo de segregação familiar da variante não foi possível devido a não disponibilidade de DNA dos familiares do paciente, apenas a mãe da paciente foi avaliada e identificada a presença da mesma variante em heterozigose (carreadora assintomática) (Figura 17B). Um padrão de herança autossômico recessivo poderia se especulado nesta família pela presença de consanguinidade dos pais. As análise de predição *in silico* revelaram que esta variante causam o efeito deletério na proteína de acordo com os programas Mutation Taster, Mutation Assessor, SIFT e Polyphen-2 (Anexo E, Tabela 9).

5.2.2.1 Descrição fenotípica do paciente CE2.II3

Paciente avaliada por genitália atípica com 4 anos e 3 meses de idade (Figura 18). Gestação e parto sem anormalidades. Registrada no sexo social masculino mas criada no sexo social feminino. Apresentava retardo de crescimento (altura 95,4 cm, DP – 2.15), retardo de desenvolvimento e dificuldade de fala. O exame genital mostrou: micropênis (tamanho do pênis de 0,6 cm de comprimento; < -2,5 DP), meato uretral glandar e gônadas não palpadas. O estudo citogenético convencional revelou cariótipo

46, XY. Na avaliação hormonal os níveis séricos de testosterona eram baixos e os de gonadotrofinas elevados. No exame ultrassonográfico de pelve e região inguinal não foram identificadas a presença de derivados müllerianos e das gônadas. Na laparoscopia exploradora o útero não foi identificado e o tecido gonadal fibroso foi retirado. O estudo histológico identificou a direita presença de área de tecido (1,0 x 0,7 mm) estromal colagenizado permeado por estrutura similar a réte testis provável área de tecido gonadal com sinais de regressão (Figura 18A). À esquerda existe réte testis adjacente a epidídimo e, junto a essa, tecido conjuntivo ricamente vascularizado (1,3 x 0,8 mm), em área (1,2 x 0,7 mm) próxima a fimbria tubárea existe área com padrão de estroma de tipo ovariano (gônada disgenética). A presença de epidídimo, ducto deferente, trompas uterinas foi observada bilateralmente (Figuras 18B e C). A mudança do sexo social masculino para o feminino foi realizada após avaliação psicológica. O paciente CE2.II3 portador de SRTE esporádica pertence a uma família consanguínea, pais eram primos em primeiro grau. Na história familiar presença de um irmão mudo e dois irmãos falecidos com 30 e 60 dias de idade de causa não conhecida. Dados apresentados na tabela 10.

Figura 18 - Aspecto das gônadas da paciente CE2.II3. A. Corte histológico da gônada direita (GD) (B, C) da gônada esquerda (GE) com o aumento 100X e 200X, coloração HE. RT: rede testis.

5.2.3 Variante alélica missense c.142C>T (p.Ala48Thr) no gene *DHX37*

A variante *missense* c.142C>T, (chr12:125470776 GRhg37, g.2893C>T, cDNA.241C>T, p.Ala48Thr; rs78936225) localizada no éxon 2 do *DHX37* foi identificada em heterozigose em uma paciente portadora de DG forma completa e esporádica (CE3.II4), oriunda da Bahia (Jacobina). O DNA da paciente, dos seus pais e dos 3 irmãos foram estudados pelo método de Sanger (Figura 19A).

Figura 19 - Eletroferograma (A) e heredograma (B) do paciente (CE3.II4) portador de SRTE esporádico. A) variante c.142C>T (p.Ala48Thr) em heterozigose na fita reversa *DHX37* presente no paciente índice, no pai (I.1) e no irmão (II.2) e ausente nos outros membros da família 5 e no controle. B) paciente afetado é indicado pela seta preta e o quadrado contendo um círculo não preenchido representa o paciente com cariótipo 46,XY com o sexo social feminino. símbolo: +/- significa variante alélica identificada em heterozigose, -/- significa variante alélica ausente nos dois alelos. ND: DNA não disponível.

A análise do padrão de metilação do *DHX37* será realizado nos indivíduos desta família e em controles, com o objetivo de avaliar um possível papel da condição de metilação do gene na variabilidade fenotípica apresentada por esta família.

As análises de predição *in silico* revelaram que esta variante causa um efeito deletério na proteína de acordo com os programas Mutation Taster, Mutation Assessor e SIFT e não deletério de acordo com o programa Polyphen-2 (Anexo C, Tabela 9).

O resultado do painel customizado não indicou a presença de outras variantes alélicas potencialmente deletérias em genes associados ao DDS. A análise do padrão de metilação entre os indivíduos desta família será realizado com objetivo de entender o papel do gene *DHX37* na variabilidade fenotípica nesta família.

5.2.3.1 Descrição fenotípica da paciente CE3.II4

Paciente avaliada por ausência de desenvolvimento puberal aos 17 anos em outro serviço. Após início de reposição hormonal (estrogênio e progestágenos) desenvolveu caracteres sexuais secundários secundários e menarca. A presença de intercorrências na gestação e parto da paciente foram negadas. O exame genital mostrou: genitália externa feminina normal e gônadas não palpadas. O estudo citogenético convencional revelou cariótipo 46, XY. Na avaliação hormonal os níveis séricos de testosterona eram baixos e os de gonadotrofinas elevados. Realizado laparoscopia exploradora com retirada de tecido gonadal fibroso. O estudo histológico identificou a presença de área composta por tecido fibroso parcialmente colagenizado com células de Leydig de permeio, correspondente à tecido gonadal em regressão (Figura 20). A presença de epidídimo, e trompas uterinas foi observada. Dados apresentados na tabela 10.

Figura 20 - Aspecto das gônadas da paciente CE3.II4. A. Corte histológico da gônada direita (GD) (B,C) da gônada esquerda (GE) com o aumento 100X e 200X, coloração HE.

5.2.4 Variantes alélicas missenses c.2020G>A (p.Arg674Trp) no gene *DHX37* e c.1103C>G (p.Pro368Arg) no gene *GATA4*.

As variantes *missenses* c.2020G>A (Chr 12:125448965 GRhg37, g.24704G>A, p.Arg674Trp) localizada no éxon 15 no *DHX37* e a c.1103C>G (Chr 8:11614549 GRhg37, g.85122C>G, p.Pro368Arg, rs775379687) localizada no éxon 6 no gene *GATA4* foram identificadas em heterozigose em uma paciente portadora de DG forma parcial e esporádica (CE4.II4), oriunda da SP (Ibituba) (Figura 21A). O estudo desta paciente foi realizado por sequenciamento de larga escala utilizando um painel customizado de genes. As duas variantes identificadas na paciente foram confirmadas utilizando-se o sequenciamento por Sanger, ambas as variantes foram pesquisadas pelo mesmo método nos pais e em uma irmã assintomática (Figura 21B).

Figura 21- Eletroferograma (A) e heredograma (B) do paciente (CE4.II4) portador de SRTE esporádico. A) variantes c.2020G>A (p.Arg674Trp) em heterozigose na fita reversa do gene *DHX37* estava presente no paciente índice e na mãe (I.2) e c.1103C>G (p.Pro368Arg) em heterozigose na fita direta do gene *GATA4* presentes no paciente índice, no pai (I.1) e na irmã (II.2) B) paciente afetado é indicado pela seta preta e círculo preenchido representa o paciente (com cariótipo 46,XY) com o sexo social feminino. ND: DNA não disponível.

A variante alélica *missense* encontrada no *DHX37* está presente em 2 transcritos diferentes: c.2020G>A no ENST00000308736 (NM_032656, 4550 pb, cDNA. 2119G>A; NP_116045, p.Arg674Trp está na região que codifica proteína de 1157 aa) e no ENST00000544745 (4116pb, c.1381G>A, cDNA. 1491G>A; p.Arg461Trp está na região que codifica proteína de 962 aa).

A variante alélica *missense* encontrada no *GATA4* está presente em 3 transcritos diferentes: c.1103C>T no ENST00000335135 (NM_002052, 3414 pb, cDNA.1661C>T; NP_002043, p.Pro368Arg está na região que codifica proteína de 442 aa), c.485C>T no ENST00000528712 (NM_00130809, 2614 pb, cDNA. 863C>T; NP_001295023, p.Pro162Arg está na região que codifica proteína de 236 aa), e no ENST00000532059 (NM_001308093, 1459pb, c.1106C>T, cDNA.1186C>T; p.Pro368Arg está na região que codifica proteína de 443 aa).

A análise de segregação familiar das variantes revelou que a variante no *DHX37* (p.Arg674Trp) estava presente em heterozigose na mãe e na irmã assintomático e

ausente no pai assintomático. A variante no GATA4 (p.Pro368Arg) foi identificada em heterozigose no pai e na irmã da paciente e ausente na mãe. O DNA de dois irmãos (XY) assintomáticos não estava disponível para estudo (Figura 21B). O padrão de herança nesta família é ainda indeterminado. As análises de predição *in silico* revelaram que ambas variantes causam o efeito deletério na proteína de acordo com os programas: Mutation Taster, Mutation Assessor, SIFT, Polyphen-2, CADD e GERP++ (Anexo C, Tabela 9).

5.2.4.1 Descrição fenotípica da paciente CE4.II4

Paciente encaminhada ao serviço por genitália atípica com 3 anos e 7 meses de idade com registro social no sexo social feminino. Gestação e parto sem intercorrências. O exame genital mostrou: clitóris de tamanho normal, fusão posterior das pregas labioescrotais, orifício perineal único e gônadas não palpadas (Figura 22). O estudo citogenético convencional revelou cariótipo 46, XY. O teste de estímulo crônico com hCG não mostrou incremento significativo nos valores de testosterona e dos precursores androgênicos. No exame ultrassonográfico de pelve e região inguinal não foi identificada a presença de derivados müllerianos e das gônadas. A paciente não apresentava nenhuma anormalidade cardíaca nos exames realizados. Cirurgia para abertura do seio urogenital foi realizada e remoção do tecido gonadal fibroso por via laparoscópica. O estudo histológico identificou a presença de pequenas áreas de tecido gonadal disgenético bilateralmente além de epidídimo e tubas uterinas rudimentares bilaterais. Dados apresentados na tabela 10.

Figura 22. Aspecto da genitália externa do paciente CE4.II4.

Tabela 10 - Fenótipo dos pacientes portadores de síndrome de regressão testicular embrionária (SRTE) e disgenesia gonadal 46,XY esporádicos com variantes alélicas identificadas no *DHX37*.

Variante Alélica	Caso esporádico 1 c.923C>T, p.Arg308Gln	Caso esporádico 2 c.451G>A, p.Arg151Trp	Caso esporádico 3 c.142C>T, p.Ala48Thr	Caso esporádico 4 c.2020G>A, p.Arg674Trp #
Estado	Heterozigoto	Homozigoto	Heterozigoto	Heterozigoto
Naturalidade	SP (SP)	PE (Buique)	BA (Jacobina)	SP (Ibituba)
Paciente	CE1.II1	CE2.II3	CE3.II4	CE4.II4
Sexo de criação	Masculino → Feminino	Masculino → Feminino	Feminino	Feminino
Idade cronológica da 1ª avaliação (anos)	30	4.3	17	3.7
Características sindrômicas	Ausentes	Retardo do desenvolvimento neuropsicomotor, distúrbio de linguagem, retardo de crescimento	Ausentes	Ausentes
Genitália externa	Masculina com Micropenis	Masculina com Micropenis	Feminina	Clitóris de tamanho normal, fusão posterior das pregas labioescrotais, orifício perineal único
Gônadas	Não palpadas			
Achados histológicos no tecido gonadal	D/E- Ausencia de tecido gonadal	D- Ausencia de tecido gonadal	D / E- Gônada disgenética	D- Gônada disgenética
Derivados Müllerianos	Tuba uterina (+) Útero (-) Epidídimo (+)	E- Gônada disgenética Tuba uterina (+) Útero (-) Epidídimo (+)	E- Gônada disgenética Tuba uterina (+) Útero (+) Epidídimo (+)	E- Gônada disgenética Tuba uterina (+) Útero (-) Epidídimo (+)
Derivados Wolfianos	Ducto deferente (-)	Ducto deferente (+)	Ducto deferente (-)	Ducto deferente (-)
LH (U/L)	10	ND	32*	27
FSH (U/L)	40	49	47*	98
Testosterona (ng/ml)	<30	<30 (pós hCG)	55 (b)	<30 (b)
Valores normais	IFME*	Crianças pré púberes	FSH 1,0-3,1*	
		Adultos	1,4-9,2*	
	RIE	Crianças pré púberes	1,0-10	Testo (b) <30 (pós hCG) 391±129
		Adultos	1,0-10	(b) 441-925 (pos-hCG) 1306±129

variante alélica identificada também no gene *GATA4* (c.1103C>G, p.Pro368Arg), (pós hCG)- valor de testosterona sérica após estímulo com gonadotrofina coriônica humana, (b)- valor de testosterona sérica basal; (+)- presente, (-)- ausente

5.3 Localização das variantes alélicas na sequência da proteína do DHX37

O gene *DHX37* está localizado no *locus* q24.31 do cromossomo 12. Este gene é constituído por 27 éxons e codifica uma proteína de 1157 aminoácidos (Figura 23). O transcrito ENST00000308736 (disponível no site www.ensembl.org) foi utilizado como sequência referência neste estudo.

No total, quatro variantes na proteína do DHX37 foram identificadas, sendo duas presentes em regiões com função desconhecidas, uma variante está presente na região conservada do domínio DEAH e a outra variante está presente no domínio Helicase C-terminal da proteína (Figura 27). E uma variante na proteína do GATA4 foi identificada em uma região conservada de função desconhecida.

Figura 23 - Localização das variantes na proteína do DHX37 identificadas pelo SEPLE e Sanger. Duas variantes provavelmente patogênicas (p.Arg308Gln e p.Arg674Trp) estão localizadas nos domínios DEAH e Helicase C-terminal. *Mutaço dignica: p.Pro368Arg no *GATA4*.

Todas as variantes levaram a troca de aminocidos muito conservados ou pouco conservados entre diferentes espcies vertebrados e invertebrados (Anexo D, Figuras 24-28).

A variante c.142C>T ocasionou uma troca do aminocido arginina (hidrfilo) para tirosina (polar) na posio 48 da protena do DHX37. O aminocido p.Ala48 est localizado no incio da protena em uma regio desconhecida e pouco conservada entre diferentes espcies de vertebrados e invertebrados (Figura 24). Assim, como a variante c.142C>T, a variante c.451G>A levou a troca do aminocido arginina (bsico) para triptofano (apolar) na regio 151, o qual tambm est localizado em uma regio com funo desconhecida. Esta regio conservada entre diferentes espcies de vertebrados e invertebrados (Figura 25). A variante c.923C>T levou a troca o aminocido arginina (bsico) para glutamina (polar no carregada) na posio 308 da regio de domnio DEAH, o qual bem conservado entre diferentes espcies de vertebrados e

invertebrados. O domínio DEAH é uma sequência de aminoácidos Asp-His-Asp-Gln, no qual existe um sítio de ligação do adenosine difosfato (Figura 26). E por fim, a variante c.2020G>A levou a troca do aminoácido arginina (básico) para triptofano (apolar) na posição 674 do domínio Helicase C-terminal. Esta região é muito conservada entre diferentes espécies de vertebrados e invertebrados (Figura 27). Essa última variante foi identificada acompanhada da variante c.1103C>G (p.Pro368Arg) no GATA4. A variante c.1103C>G no GATA4 levou a troca do aminoácido prolina (apolar) para arginina (básico) na posição 368 da proteína, em uma região de função desconhecida, conservada entre diferentes espécies de vertebrados e invertebrados (Figura 28).

5.4 Análise da rede de interação entre as proteínas helicases e a proteína do DHX37.

O DHX37 interage através de uma região de domínio de ligação ao DNA com a helicase DHX15, a qual pertence a família de RNA helicase e codifica uma proteína com o domínio DEAH, através dos bancos de dados do NCBI e Biogrid.

A proteína DHX15 está presente na região nuclear das células germinativas (espermatogonias, espermátócitos, espermátides) e de Leydig e ausente nos espermatozóides e nas células de Sertoli (The Protein Human Atlas).

A proteína DHX15 interage através de uma região de domínio de ativação do DNA com uma outra helicase, DDX5/p68 (Dead/H Box 5) que codifica a proteína com o domínio DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp). Essa proteína está presente no núcleo das células germinativas (espermatogonias, espermátócitos, espermátides) e de Leydig e ausente nos espermatozóides e nas células de Sertoli (The Protein Human Atlas).

O DDX5/p68 interage diretamente na região promotora do AKT1 (V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1), uma quinase importante que interage com os componentes da via MAPK. A proteína do AKT1/PKB (Protein Kinase B) está presente nas células germinativas (presente nas espermatogonias, espermátócitos, espermátides e ausente nos espermatozóides), células de Sertoli e de Leydig (The Protein Human Atlas). A Figura 29 ilustra essa rede de interações entre as proteínas mencionadas acima.

Figure 29 - Redes de interações entre DHX37 e outras proteínas envolvidas na via MAPK.

5.5 Análise do efeito fundador na variante c.923C>T (p.Arg308Gln)

A presença de uma variante alélica comum em heterozigose (p.Arg308Gln) em ambas famílias com SRTE estudadas por SEPLE determinou a análise do efeito fundador para esta variante utilizando oito dos vinte e nove marcadores (polimorfismos M10-M13 e M15-M18) mais próximos da variante (M14) (Figura 30). As diferenças observadas nos diversos haplótipos selecionados e situados no braço longo do cromossomo 12 próximo da variante p.Arg308Gln, demonstraram que não existe um efeito fundador entre as duas famílias estudadas. Portanto, consideramos esta variante como uma variante recorrente.

Figura 30 - Vinte e nove marcadores foram utilizados para análise da região do cromossomo 12q, localização a variante p.Arg308Gln, nas duas famílias não aparentadas (F1 e F2). Os dados foram obtidos a partir dos resultados do SEPLE e organizados através do programa *Beagle*.

As diferenças observadas nos diversos haplótipos selecionados e situados no braço longo do cromossomo 12 próximo da variante p.Arg308Gln, demonstraram que não existe um efeito fundador entre as duas famílias estudadas. Portanto, consideramos esta variante como recorrente na presente geração com os casos de SRTE.

5.6 Frequência alélica e probabilidade de distribuição das variantes identificadas nos pacientes e nos controles

As frequências alélicas das diferentes variantes identificadas no DHX37 nos pacientes avaliados neste estudo e descritas nas bases de dados populacionais disponíveis (EXAC, 1000GENOME, ESP6500 e gnomAD) estão apresentadas resumidamente na tabela 12.

Estes resultados sugerem que a variante p.Arg308Gln é uma variante rara com uma provável relevância clínica e a variante p.Arg151Trp é uma variante relativamente rara com uma relevância clínica incerta na nossa casuística. A variante p.Ala48Thr é uma variante relativamente comum sem provável relevância clínica na nossa casuística. A variante p.Arg674Trp é uma variante rara; porém, a sua relevância clínica é ainda incerta devido a associação com outra variante alélica, p.Pro368Arg, identificada no

gene *GATA4*. Esta última variante, p.Pro368Arg, é uma variante relativamente rara com uma relevância clínica incerta na nossa casuística.

As quatro variantes identificadas no *DHX37* foram classificadas de acordo o guia do ACMG como variantes: provavelmente patogênica (p.Arg308Gln), de significância clínica incerta (p.Arg151Trp, p.Arg674Trp) e benigna (p.Ala48Thr) (51).

5.7 Análise do estado de metilação do gene *DHX37* em membros das duas famílias não aparentadas (1 e 2) e nos controles normais.

A análise do padrão de metilação do gene *DHX37* foi realizada no DNA dos membros afetados e não afetados (carreadores assintomáticos e não carreadores da variante) das duas famílias não aparentadas nas quais a variante alélica p.Arg308Gln foi identificada. Nesta análise, incluímos também os DNAs dos controles de ambos os sexos. Os resultados da análise revelaram a presença de 54 sondas distribuídas nos sítios CpGs diferencialmente metilados e não metilados no gene *DHX37* (Figura 31).

Figura 31 - Heatmap representando a densidade dos valores de beta identificados nos membros das famílias 1 e 2 e controles normais. Demonstrando um perfil de metilação diferencial entre as cinquenta e quatro sondas distribuídas no gene, de acordo com os valores beta representados na escala de cores entre verde (beta = 0) e vermelho (beta = 1). A seta preta indica um sítio de CpGs metilado observado somente na amostra do pai da Família 1 (II.3, caixa preta vazia) em relação aos seus filhos (III.2 e III.3), a Família 2 (II.2, II.4, III.1) e os controles masculino e feminino.

Análise do estado de metilação na região promotora do gene DHX37, em uma das fitas do DNA, mostrou que a região TSS (Transcription Start Site), situada a 200 pb antes da região 5'UTR estava metilada (posição cromossômica - chr:12:124039441-124039777) (Figura 32; Tabela 13).

Figure 32 - Localização da região identificada no promotor do *DHX37* com diferentes padrões de metilação em membros da Família 1. TSS (Transcription Start Site) situado a 200 pb antes da região 5'UTR do *DHX37*..

5.8 Avaliação de expressão da proteína em tecidos normais

Na histologia, observou-se a presença de apenas um tipo de células germinativa (CGs), espermatogônias, nos testículos de padrão infantil (27 e 33 semanas durante a gestação e 53 e 180 dias pós gestação) (Figura 33A, B, C, D) e mais do que dois tipos células (espermatogônias, espermatócitos, espermatídes e espermatozóides) nos testículos de padrão adulto (indivíduos de 13, 23 e 53 anos) (Figura 33E, F, G, H). Outras células gonadais estavam presentes em todos os tecidos, tais como as células de Sertoli, Leydig e intersticiais. Contudo, foi possível realizar a técnica de imunohistoquímica para caracterizar a localização da proteína do *DHX37* em alguns tecidos gonadais.

Figura 33 - Imagens de microscopia de luz de corte histológico de tecidos testiculares de indivíduos normais de diferentes idades com marcação nas células germinativas. Testículos de padrão infantil com marcação DHX37 localizada no citoplasma e membrana nuclear das espermatogônias. Testículos de adulto com marcação DHX37 localizada nas células em diferentes fases da espermatogênese apresentam diferentes padrões de marcação. Marcação no citoplasma e membrana nuclear em espermatogônias e espermatócitos, padrão circunferencial denso perinuclear em espermatócitos, padrão exclusivamente paranuclear e pontual nas espermátides (indicadas pela seta preta), marcação ausente nos espermatozoides (indicado pela seta vermelha). Imagens com o aumento original de 200X.

A imunomarcação da proteína DHX37 revelou a sua presença na membrana nuclear e no citoplasma das espermatogônias nos tecidos infantis e adultos. Em tecidos adultos, das espermatogônias a espermatócitos, a proteína passa por um progressivo

adensamento ao redor do núcleo, gerando um padrão circunferencial denso perinuclear à medida que as células se diferenciam. Nas espermatídes, o padrão de marcação foi exclusivamente paranuclear e pontual e nos espermatozóides estava ausente. As células de Leydig e células estromais apresentavam marcação citoplasmática e nas células de Sertoli não houve imunomarcação (Figura 34).

Figura 34 - Imagem de microscopia de luz de corte histológico de testículo adulto de um indivíduo com 13 anos de idade com marcação DHX37 ausente nas células de Sertoli, indicada pela seta preta. Imagem do tecido com o aumento de 200X.

No tecido testicular de um único caso com vestígios de regressão testicular, a histologia revelou a presença de células de Sertoli e ausência de células germinativas em um túbulo seminífero isolado (Figura 13C). Não foi possível a realização da imunohistoquímica neste material.

6. Discussão

5.1 Investigação genética nos casos de distúrbios do desenvolvimento sexual 46,XY

Desde a identificação do gene *SRY* como fator determinante testicular por Sinclair na década de 1990 (24), utilizando a técnica de *Southern blotting*, as técnicas de biologia molecular progrediram e permitiram a identificação de novos genes envolvidos no processo de determinação gonadal (34).

O método de sequenciamento de Sanger, muito utilizado no diagnóstico etiológico dos pacientes com DDS 46,XY associado a anormalidade do desenvolvimento gonadal, permite estabelecer o diagnóstico em apenas uma pequena parcela destes pacientes (34). O sequenciamento de nova geração é uma ferramenta eficiente no diagnóstico genético (21) e por isso utilizamos esta metodologia na pesquisa de variantes alélicas potencialmente causadoras de doença em duas famílias não aparentadas com membros portadores de SRTE.

Famílias portadoras de anormalidades do desenvolvimento testicular são raras, e constituem modelos de estudos fundamentais para a compreensão do modo de transmissão dessas doenças bem como na identificação de novos fatores genéticos envolvidos na sua etiologia (64).

No presente estudo, os quatro pacientes com SRTE familiar inicialmente estudados apresentavam fenótipos muito semelhantes caracterizados por micropênis e gônadas não palpadas. Estes pacientes apresentavam gônadas ausentes ou presença de pequenas gônadas disgenéticas e ausência de útero (Tabelas 8 e 10).

Na investigação genética pelo SEPLE e confirmada por Sanger, identificamos uma única, nova e rara variante alélica, c.923C>T (p.Arg308Gln) em heterozigose, no gene *DHX37* nos membros afetados das duas famílias não aparentadas, no pai da F1 e na mãe do F2 (Figuras 10). A avaliação do grau de conservação entre as espécies e do impacto funcional da nova variante através de vários programas de predição *in silico* (Anexo C, Tabela 9), e da frequência desta variante alélica nos diferentes bancos de dados populacionais (Anexo C, Tabelas 11 e 12) indicou esta variante alélica como potencialmente causadora de doença (SRTE).

A análise de segregação na família 1 revelou a presença da variante p.Arg308Gln em heterozigose no pai não afetado além dos filhos afetados; e na família

2, a presença da variante em heterozigose na irmã do paciente índice além dos dois afetados (Figura 11).

O padrão de segregação observado no nosso estudo sugere uma herança autossômica dominante com penetrância incompleta, visto o fenótipo normal do pai da família 1, carreador da variante (Figura 11). Diferentes padrões de herança foram descritos em pacientes com disgenesia gonadal e em várias famílias a presença de indivíduos masculinos normais (pais e irmãos) carreadores de mutações associadas à doença são descritos na literatura (65). A presença de mosaicismos nos carreadores assintomáticos das mutações foi identificada em algumas famílias (65,66). A variabilidade fenotípica de pacientes com disgenesia gonadal familiar também foi associada a causas epigenéticas. (67).

A condição de penetrância incompleta, como observado na família 1, pode ser explicada pela existência de mecanismos moduladores, nos quais a interação de vários fatores como genes moduladores, fatores ambientais, presença de mosaicismos e fatores epigenéticos podem modificar o fenótipo (68).

No pai da família 1, carreador não afetado da variante p.Arg308Gln, o sítio CpG na região promotora TSS200 (chr:12:124039441-124039777) do gene *DHX37* estava hipometilado (valor beta: 0.13080021; hipo: 0-0.2 e hiper: 0.8-1) ao comparamos com os padrões de metilação da mesma região nos filhos afetados (F1.III2 [valor beta:0.2398]; F1.III3 [valor beta: 0.2359]), nos dois membros afetados da família 2 (F2.II2 [valor beta: 0.3119]; F2.II3 [valor beta: 0.3544]; F2.III1 [valor beta: 0.2607]) e nos controles analisados (masculino - valor beta: 0.4585; feminino - valor beta: 0.3522) (Figura 30; Anexo C, Tabela 13).

A hipometilação da região promotora do *DHX37* poderia ter protegido o pai de desenvolver a doença. Sugerimos que a presença dessa condição de metilação nas células testiculares do pai poderia determinar um aumento na expressão da proteína *DHX37* selvagem, suplantando o impacto deletério da proteína *DHX37* e permitindo o desenvolvimento do fenótipo masculino normal. A avaliação de um maior número de amostras de controles e indivíduos carreadores assintomáticos de variantes do *DHX37* é necessária para avaliar o real impacto da hipometilação da região promotora do *DHX37* na expressão da proteína. Estudos *in vitro* serão necessários para confirmar os nossos achados (69).

Diferenças no padrão de metilação no gene *DHX37* foi previamente relatado no estudo de pacientes com esquizofrenia (70). O padrão de metilação do gene *DHX37* e de outros genes relacionados aos processos de apoptose celular, transmissão sináptica e do desenvolvimento do sistema neuronal foi avaliado em pacientes com esquizofrenia pelo método de *microarray* de alta resolução. Os resultados deste estudo demonstraram que a região intragênica do *DHX37* estava metilada em pacientes masculinos esquizofrênicos quando comparados com os controles de ambos os sexos e pacientes do sexo feminino, sugerido pelos autores que este achado poderia contribuir na explicação das diferenças na incidência da doença entre os dois sexos.

Todas as evidências mencionadas acima indicam um possível papel do *DHX37* na etiologia da SRTE familiar e resultaram na adição de uma coorte de trinta e cinco pacientes com DDS 46, XY por anormalidades do desenvolvimento gonadal esporádicos, que foram estudados por sequenciamento pelo método de Sanger ou por painel de genes candidatos para DDS.

Neste grupo de pacientes, a variante c.923C>T (p.Arg308Gln) foi novamente identificada em heterozigose em um paciente com SRTE esporádica. O efeito fundador desta variante foi excluído pela análise dos dados das duas famílias com SRTE gerados pelo sequenciamento do exoma (Figura 29).

Outras três novas variantes alélicas do tipo *missense*, c.451G>A (p.Arg151Trp) em homozigose, c.2020G>A (p.Arg674Trp) e c.142C>T (p.Ala48Thr) ambas em heterozigose, foram identificadas em pacientes portadores de SRTE, DGP e DGC não familiar respectivamente, ampliando o espectro fenotípico dos pacientes com variantes no *DHX37*.

A dosagem genica poderia explicar a diferença de fenótipos em pacientes com DG 46,XY e indivíduos assintomáticos carreadores de variantes alélicas patogênicas (71). Mutações em homozigose têm sido reportadas em pacientes com DG 46,XY completa (e insuficiência adrenal), mas parentes carreadores dessas mutações em heterozigose são assintomáticos, assim como observado no caso do paciente portador de SRTE com a variante p.Arg151Trp.

Um largo espectro de apresentações fenotípicas é observado frequentemente em pacientes com mutações em genes envolvidos na etiologia dos DDS 46,XY associados a

anormalidades do desenvolvimento testicular, como reportado nos genes *NR5A1* e *MAP3K1* (27,72,73).

O uso de técnicas de sequenciamento exômico em larga escala (como SEPLE) e sequenciamento por painel de genes customizados tem permitido a identificação de anormalidades em mais de um gene da cascata de determinação gonadal no mesmo paciente (21). O sequenciamento por painel gênico customizado identificou as variantes c.2020G>A (p.Arg674Trp) no *DHX37* e c.1103C>G (p.Pro368Arg) no *GATA4* na paciente com diagnóstico de DG 46,XY esporádica forma parcial sem doença cardíaca. Ambas as variantes alélicas, no *DHX37* e no *GATA4*, foram classificadas como provavelmente patogênicas pelos critérios do ACMG. Mutações no gene *GATA4* foram associadas com anormalidades cardíacas congênitas e em raros casos associadas a DG 46,XY (74). O estudo de segregação familiar das duas variantes revelou que o pai era carreador da variante (p.Pro368Arg) no *GATA4* e a mãe carreadora da variante (p.Arg674Trp) no *DHX37* (Figura 21).

Diferentemente das outras variantes identificadas no *DHX37*, a variante c.142C>T (p.Ala48Thr) foi considerada não deletéria nos critérios de classificação do ACMG, e o significado desta variante na etiologia da doença é incerto. Variantes alélicas potencialmente deletérias em genes da via de determinação gonadal masculina foram excluídos nesta paciente em estudos utilizando-se o método de Sanger e sequenciamento por painel de genes candidatos. A análise do estado de metilação da região promotora do gene *DHX37* será realizada nos membros desta família avaliando-se uma possível correlação com a variabilidade fenotípica apresentada, corroborando com os resultados observados no estudo da Família 1.

A avaliação sobre o papel individual (22) e combinado dessas variantes alélicas identificadas na etiologia da disgenesia gonadal implicará em estudos funcionais complexos, como avaliar o seu efeito nos genes alvos da cascata da via masculina pertencentes a via MAPK, serão importantes para esclarecer as repercussões funcionais desta proteína DHX37 modificada (10).

5.2 Novo gene candidato para os DDS 46,XY: *DHX37*

As evidências acumuladas neste estudo indicam o gene *DHX37* como um novo gene candidato para a etiologia dos DDS 46,XY associados a anormalidades do desenvolvimento gonadal.

O gene *DHX37*, localizado no cromossomo 12p24.31, codifica uma proteína RNA helicase que pertence à família DEAH (Asp-Glu-Ala-His). As helicases estão envolvidas em vários aspectos do metabolismo do RNA, incluindo transcrição, *splicing*, biogênese do ribossomo (75,76), tradução e degradação (77) e controle dos processos de crescimento, proliferação e diferenciação celular (77,78). As proteínas codificadas por helicases são conhecidas pelo seu envolvimento na embriogênese e espermatogênese (77,78).

A função específica da proteína DHX37 e suas possíveis vias celulares de atuação ainda são pouco conhecidas. Estudos com leveduras revelaram que a proteína DHX37 (conhecida como Dhr1) tem um papel fundamental na biogênese ribossômica e na regulação da expressão gênica (79).

No modelo animal de peixe-zebra (*Danio rerio*), Hirata e cols foram os primeiros a descreverem a presença de uma variante recessiva espontânea (p.Leu489Pro) no gene *dhx37* em animais portadores de um defeito no comportamento de escape natatório observado após 2 dias pós fertilização. Essa alteração resultou em uma troca de aminoácidos na região de domínio Helicase-C terminal, importante na ação transcricional. Posteriormente, os mesmos autores demonstraram, em peixe-zebra nocauteado por morfolino, que o DHX37 é requerido para a biogênese do receptor de glicina, o qual regula diretamente a transmissão sináptica glicinérgica (80). Nestes trabalhos, os autores descreveram apenas o fenótipo do distúrbio neurológico observado no animal mutado e nenhuma referência ao desenvolvimento sexual ou fertilidade deste animal foi relatado.

Em humanos, mutações de ponto no *DHX37* foram identificadas por sequenciamento exômico em pacientes com doença neurológica e malformações cerebrais (81). Mutações em homozigose no *DHX37* (p.Asn419Lys e p.Arg487His) foram encontradas em pacientes de duas famílias consanguíneas com microcefalia, atraso do desenvolvimento ou incapacidade intelectual e atrofia cortical. Nenhuma descrição do aspecto da genitália externa do paciente masculino estava disponível. A substituição do aminoácido p.Asn419 ocorreu em uma região próxima do domínio

DEAH, o qual tem um papel fundamental nos processos de iniciação da tradução do RNA e no *splicing* do pré-mRNA (79).

Deleções do braço longo do cromossomo 12 contendo a região 24.31 foram previamente descritas em pacientes com diferentes características sindrômicas e anormalidades genitais ou hipogonadismo (82–84).

Sathya e colaboradores relataram um paciente avaliado aos 9 meses de idade que apresentava retardo do desenvolvimento neuropsicomotor, traqueomalácia, múltiplas anormalidades faciais e genitália atípica caracterizada por escroto bífido, hipospadia proximal e chordee, com tamanho peniano normal e gônadas palpadas bilateralmente, no qual foi encontrado uma deleção na posição cromossômica 12q24.31-24.33 (82).

Al-Zahrani e colaboradores reportaram uma deleção de 9 kb no cromossomo 12 (q24.31-33) em um paciente com retardo do desenvolvimento neuropsicomotor, características dismórficas, baixa estatura, escoliose, micropênis e gônadas não palpáveis (83). Pacientes com deleção no cromossomo 12q24 sem anormalidades da genitália externa tinham sido também descritos previamente (84).

Nenhuma variante nos genes *NCOR2* (OMIM*600848), *STX2* (OMIM*132350), *TESC* (OMIM*611585), *FBXW8* (OMIM*609073) e *TBX3* (OMIM*601621) foi identificada na região 12q.24.31, além daquelas encontradas no gene *DHX37* em nossos pacientes. O fenótipo dos pacientes com deleções no 12q24.31 reforça a hipótese de que o *DHX37* está envolvido na etiologia das anormalidades do desenvolvimento testicular.

Interessante, que o *DHX37* poderia controlar via enhancer a expressão do gene *NCOR2* (Genecards, disponível no site: <http://www.genecards.org/>), o qual é capaz de regular a magnitude de resposta do hormônio andrógeno através da regulação transcricional do receptor androgênico (85,86).

5.4 Vias de interação do DHX37 no tecido gonadal

O *DHX37* pode interagir de forma indireta com a helicase DDX5/p68 (Dead/H Box 5) via a helicase *DHX15* conforme as informações descritas no banco de dados Biogrid e no NCBI. A helicase *DHX15* é fortemente expressa nas células germinativas masculinas (87) (*The Protein Human Atlas*) e pode interagir de forma direta com a helicase DDX5/p68, modulando a sua expressão através da sua ligação na região 3'UTR

do DDX5/p68 (88). O DDX5/p68 é um membro da família RNA helicase que codifica o domínio DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) e está envolvido na regulação negativa da via Wnt (89).

O padrão de expressão do *DHX37* em amostras de testículos de controles masculinos de diferentes faixas etárias avaliados neste estudo, estabeleceu que o *DHX37* se expressa em células germinativas em diferentes estágios de maturação (Figura 33), um padrão semelhante ao das outras helicases *DHX15* e *DDX5/p68* (*The Protein Human Atlas*), o que reforça a ideia de uma possível interação dessas helicases nestas células.

Estudos utilizando células de carcinoma de colón humano e de camundongo demonstraram que o *DDX5/p68* é capaz de regular diretamente a expressão da quinase *AKT1*, pela interação com a região promotora deste gene (90). A quinase *AKT1* têm sido relacionada a processos anti-apoptóticos nas células germinativas masculinas (91).

A proteína *AKT1* é expressa nas células germinativas num padrão semelhante às das helicases citadas anteriormente (*DHX15*, *DDX5/p68* e o *DHX37*) (*The Protein Human Atlas*). A quinase *AKT1* também está expressa nas células de Sertoli e um papel importante na proliferação e diferenciação destas células em ratos foi reportado (92).

A quinase *AKT1* pode regular a fosforilação de outras quinases, tais como *p38* (*MAKP14*) e *ERK1/2* (*MAPK3/1*) através da modulação que exerce na atividade do complexo *MAP3K1 - RHOA/ROCK* (Biogrid e String), etapas envolvidas do processo de determinação testicular (9,93–96).

Fatores de crescimento secretados pelas células germinativas masculinas têm sido associados à manutenção das funções das células de Sertoli, incluindo a produção proteica e a integridade da barreira hemato-testicular (97–99). Além disso, a presença de uma comunicação ativa entre as células germinativas e de Sertoli, sugere que as células germinativas poderiam ter algum papel na função das células de Sertoli e na manutenção do testículo (6).

5.3 Papel do *DHX37* na determinação testicular

Propomos que a interação direta e indireta do *DHX37* com outras helicases (*DHX15* e *DDX5/p68*) regularia a fosforilação normal da quinase *AKT1*, uma quinase

que participa da regulação da via RHOA/ROCK. O complexo RHOA/ROCK-MAP3K1 regula a atividade de fosforilação normal das quinases p38 e ERK1/2, que atuam bloqueando a via da β -catenina, e estimulando a cascata masculina via *SOX9* (10) (Figura 35A). Mutações no *DHX37* causaria modificações nas interações de helicases e quinases resultando em hiperfosforilação das quinases p38MAPK e ERK1/2 com ativação da via da β -catenina e bloqueio da via de determinação testicular (*SOX9*) determinando o desenvolvimento de um testículo anormal (Figura 35B).

Figura 35 - Esquema representativo da participação do DHX37 no processo de determinação gonadal masculino. **A.** Desenvolvimento testicular normal- A interação do DHX37 com outras helicases (DHX15 e DDX5/p68) leva à fosforilação normal da quinase AKT1, que interage com via RHOA/ROCK - a via MAPK (MAP3K1 - MAP3K4) que determina a fosforilação normal das quinases p38MAPK e ERK1/2, que bloqueia a via da β -catenina e promove o desenvolvimento testicular via *SOX9*. **B.** Desenvolvimento testicular anormal- Modificações no DHX37 que interferem com a interação normal das helicases (DHX15 e DDX5/p68), diminuindo a fosforilação

da quinase AKT1, determinaria um aumento da sinalização RHOA/ROCK - via MAPK e à hiperfosforilação das quinases p38MAPK e ERK1/2 com ativação da via da β -catenina e bloqueio da via de determinação testicular (SOX9) resultando no desenvolvimento de um testículo anormal. Fatores da via testicular são mostrados em azul e ovarianos em vermelho. Fatores que promovem a ação de alvos abaixo são mostrados com setas. Fatores que bloqueiam a ação de alvos abaixo são mostrados com linhas vermelhas. Modificado de Loke et al., 2013 (10).

5.4 Perspectivas futuras

Estudos funcionais *in vitro* e *in vivo* são necessários (69,100) para determinar o mecanismo de ação do DHX37 nos processos de determinação e manutenção do tecido testicular bem como o esclarecimento dos efeitos biológicos das variantes identificadas neste estudo.

7. Conclusões

1. Identificamos uma única e nova variante c.923C>T (p.Arg308Gln) em heterozigose do *DHX37* provavelmente patogênica, em portadores de SRTE familiar estudados pelo SEPLE e confirmada por Sanger. O efeito fundador desta variante foi excluído pela análise dos dados gerados pelo SEPLE.
 - 2.1 Em quatro pacientes com DDS 46,XY associados a anormalidade do desenvolvimento gonadal esporádico foram identificadas as variantes no *DHX37*:
 - a) c.923C>T (p.Arg308Gln) em heterozigose em um paciente com SRTE;
 - b) c.451G>A (p.Arg151Trp) em homozigose em um paciente com SRTE;
 - c) c.142C>T (p.Ala48Thr) em heterozigose em uma paciente com disgenesia gonadal completa;
 - d) e c.2020G>A (p.Arg674Trp) em heterozigose em uma paciente portadora de disgenesia gonadal parcial.
 - 2.2 As novas variantes identificadas no grupo de pacientes com doença esporádica foram classificadas de acordo com os critérios do Colégio Americano de Genética Médica, como:
 - a) variante de significado incerto (p.Arg151Trp);
 - b) benigna (p.Ala48Thr);
 - c) e potencialmente patogênica (p.Arg674Trp). Na mesma paciente, foi identificada uma variante potencialmente patogênica em heterozigose no gene *GATA4* (p.Pro368Arg).
 3. A análise de segregação familiar demonstrou vários padrões de herança, sendo: autossômico dominante com penetrância incompleta (p.Ala48Thr, p.Arg308Gln), autossômico recessivo (p.Arg151Trp) e incerto (p.Arg674Trp e p.Pro368Arg).
 4. Os diferentes padrões de metilação do sítio CpG identificados na região promotora do gene *DHX37* foi sugerido como um possível mecanismo modulador da variabilidade fenotípica observada em carreadores afetados e não afetados da variante p.Arg308Gln
-

5. A análise imuno-histoquímica da expressão da proteína DHX37 em amostras de testículos normais identificou que esta proteína é expressa em células germinativas em diferentes estágios de maturação. Este achado confirma que a proteína DHX37 tenha um papel na espermatogênese humana,
6. Pela primeira vez, o gene *DHX37* foi relatado como um novo componente da via de determinação e/ou manutenção gonadal masculina.

8. Referências

1. Wilhelm D, Yang JX, Thomas P. Mammalian Sex Determination and Gonad Development. *Curr Top Dev Biol*. 2013;106:89–121.
2. Ono M, Harley VR. Disorders of sex development: new genes, new concepts. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9(2):79–91.
3. Sadler TW. *Embriologia Médica. langman's Med Embryol*. 2001;8ª edição:3–84.
4. Merchant H. Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. *Dev Biol*. 1975;44(1):1–21.
5. McLaren A. Meiosis and differentiation of mouse germ cells. *Symp Soc Exp Biol*. 1984;38:7–23.
6. Tian R-H, Yang S, Zhu Z-J, Wang J-L, Liu Y, Yao C, et al. NODAL secreted by male germ cells regulates the proliferation and function of human Sertoli cells from obstructive azoospermia and nonobstructive azoospermia patients. *Asian J Androl. Medknow Publications and Media Pvt. Ltd.*; 2015;17(6):996–1005.
7. Jégou B. Spermatids are regulators of Sertoli cell function. *Ann N Y Acad Sci*. 1991;637(89):340–53.
8. Pineau C, Sharpe RM, Saunders PTK, Gérard N, Jégou B. Regulation of Sertoli cell inhibin production and of inhibin α -subunit mRNA levels by specific germ cell types. *Mol Cell Endocrinol*. 1990;72(1):13–22.
9. Bogani D, Siggers P, Brixey R, Warr N, Beddow S, Edwards J, et al. Loss of mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 (MAP3K4) reveals a requirement for MAPK signalling in mouse sex determination. *PLoS Biol*. 2009;7(9).
10. Loke J, Pearlman A, Radi O, Zuffardi O, Giussani U, Pallotta R, et al. Mutations in MAP3K1 tilt the balance from SOX9/FGF9 to WNT/b-catenin signaling. *Hum Mol Genet*. 2014;23(4):1073–83.
11. Matson CK, Murphy MW, Sarver AL, Griswold MD, Bardwell VJ, Zarkower D. DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature*. 2011;9(7358):1–5.
12. Uhlenhaut NH, Jakob S, Anlag K, Eisenberger T, Sekido R, Kress J, et al. Somatic Sex Reprogramming of Adult Ovaries to Testes by FOXL2 Ablation. *Cell*. 2009;139(6):1130–42.
13. Mendonca BB, Domenice S, Arnhold IJP, Costa EMF. 46,XY disorders of sex development (DSD). Vol. 70, *Clinical Endocrinology*. 2009. p. 173–87.
14. Eggers S, Ohnesorg T, Sinclair A. Genetic regulation of mammalian gonad

- development. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(11):673–83.
15. Hutson JM, Grover SR, O’Connell M, Pennell SD. Malformation syndromes associated with disorders of sex development. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2014;10(8):476–87.
 16. Sax L. How Common Is Intersex? A Response to Anne Fausto-Sterling. *J Sex Res*. 2002;39(3):174–8.
 17. Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, Lee PA. Consensus statement on management of intersex disorders. *J Pediatr Urol*. 2006;2(3):148–62.
 18. Flück CE, Meyer-Böni M, Pandey A V., Kempná P, Miller WL, Schoenle EJ, et al. Why boys will be boys: Two pathways of fetal testicular androgen biosynthesis are needed for male sexual differentiation. *Am J Hum Genet*. 2011;89(2):201–18.
 19. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod*. 2001;16(5):972–8.
 20. Mouriquand PDE, Gorduza DB, Gay CL, Meyer-Bahlburg HFL, Baker L, Baskin LS, et al. Surgery in disorders of sex development (DSD) with a gender issue: If (why), when, and how? Vol. 12, *Journal of Pediatric Urology*. 2016. p. 139–49.
 21. Baxter RM, Arboleda VA, Lee H, Barseghyan H, Adam MP, Fechner PY, et al. Exome Sequencing for the Diagnosis of 46,XY Disorders of Sex Development. *J Clin Endocrinol Metab*. Endocrine Society Chevy Chase, MD ; 2015 Feb;100(2):E333–44.
 22. Mazen I, Abdel-Hamid M, Mekawy M, Bignon-Topalovic J, Boudjenah R, El Gammal M, et al. Identification of NR5A1; Mutations and Possible Digenic Inheritance in 46,XY Gonadal Dysgenesis. *Sex Dev*. Karger Publishers; 2016 May 12;0(0).
 23. Marcantonio SM, Fechner PY, Migeon CJ, Perlman EJ, Berkovitz GD. Embryonic testicular regression sequence: A part of the clinical spectrum of 46,XY gonadal dysgenesis. *Am J Med Genet*. 1994;49(1):1–5.
 24. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*. Nature Publishing Group; 1990 Jul 19;346(6281):240–4.
 25. Jameson JL, Achermann JC, Ito M, Ito M, Hindmarsh PC. A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet*. 1999 Jun 1;22(2):125–6. 26. Eggers S, Sinclair A.
-

-
- Mammalian sex determination-insights from humans and mice. *Chromosom Res.* 2012;20(1):215–38.
27. Pearlman A, Loke J, Le Caignec C, White S, Chin L, Friedman A, et al. Mutations in MAP3K1 cause 46,XY disorders of sex development and implicate a common signal transduction pathway in human testis determination. *Am J Hum Genet.* 2010;87(6):898–904.
 28. McElreavey K, Fellous M. Sex determination and the Y chromosome. *Am J Med Genet [Internet].* 1999 Dec 29;89(4):176–85.
 29. Köhler B, Achermann JC. Update - Steroidogenic factor 1 (SF-1, NR5A1). Vol. 35, *Minerva Endocrinologica.* 2010. p. 72–85.
 30. Da Silva TE, Nishi MY, Costa EMF, Martin RM, Carvalho FM, Mendonça BB, et al. A novel WT1 heterozygous nonsense mutation (p.K248X) causing a mild and slightly progressive nephropathy in a 46, XY patient with Denys-Drash syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2011;26(8):1311–5.
 31. Foster J, Dominguez-Steglich M, Guioli S, et al. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature.* 1994;372(6506):525–30.
 32. Lourenço D, Brauner R, Rybczynska M, Nihoul-Fékété C, McElreavey K, Bashamboo A. Loss-of-function mutation in GATA4 causes anomalies of human testicular development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(4):1597–602.
 33. Barbaro M, Cicognani A, Balsamo A, Löfgren A, Baldazzi L, Wedell A, et al. Gene dosage imbalances in patients with 46,XY gonadal DSD detected by an in-house-designed synthetic probe set for multiplex ligation-dependent probe amplification analysis. *Clin Genet.* 2008;73(5):453–64.
 34. Achermann JC, Domenice S, Bachega TASS, Nishi MY, Mendonça BB. Disorders of sex development: effect of molecular diagnostics. *Nat Rev Endocrino.* 2015 May 5;11(8):478–88.
 35. Baetens D, Mladenov W, Delle Chiaie B, Menten B, Desloovere A, Iotova V, et al. Extensive clinical, hormonal and genetic screening in a large consecutive series of 46,XY neonates and infants with atypical sexual development. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:209.
 36. Ledig S, Hiort O, Scherer G, Hoffmann M, Wolff G, Morlot S, et al. Array-CGH analysis in patients with syndromic and non-syndromic XY gonadal dysgenesis: evaluation of array CGH as diagnostic tool and search for new candidate loci. *Hum Repro.* 2010;25(10): 2637–2646.
 37. Norling A, Lindén Hirschberg A, Iwarsson E, Persson B, Wedell A, Barbaro M.
-

-
- Novel candidate genes for 46,XY gonadal dysgenesis identified by a customized 1M array-CGH platform. *Eur J Med Genet.* 2013;56(12):661–8.
38. White S, Ohnesorg T, Notini A, Roeszler K, Hewitt J, Daggag H, et al. Copy number variation in patients with disorders of sex development due to 46,XY gonadal dysgenesis. *PLoS One.* 2011;6(3).
39. Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, Shen Y, Chen L, McGuire A, et al. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature.* Nature Publishing Group; 2008 Apr 17;452(7189):872–6.
40. Eggers S, Smith KR, Bahlo M, Looijenga LH, Drop SL, Juniarto ZA, et al. Whole exome sequencing combined with linkage analysis identifies a novel 3 bp deletion in NR5A1. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(4):486–93.
41. Arboleda V a, Lee H, Sánchez FJ, Délot EC, Sandberg DE, Grody WW, et al. Targeted massively parallel sequencing provides comprehensive genetic diagnosis for patients with disorders of sex development. *Clin Genet .* 2013;83(1):35–43.
42. Bashamboo A, Brauner R, Bignon-Topalovic J, Lortat-Jacob S, Karageorgou V, Lourenco D, et al. Mutations in the FOG2/ZFPM2 gene are associated with anomalies of human testis determination. *Hum Mol Genet.* 2014 Jul 15;23(14):3657–65.
43. Callier P, Calvel P, Matevossian A, Makrythanasis P, Bernard P, Kurosaka H, et al. Loss of Function Mutation in the Palmitoyl-Transferase HHAT Leads to Syndromic 46,XY Disorder of Sex Development by Impeding Hedgehog Protein Palmitoylation and Signaling. *PLoS Genet.* 2014;10(5).
44. Eggers S, Sadedin S, van den Bergen JA, Robevska G, Ohnesorg T, Hewitt J, et al. Disorders of sex development: insights from targeted gene sequencing of a large international patient cohort. *Genome Biol.* 2016;17(1):243.
45. Machado AZ, da Silva TE, Frade Costa EM, dos Santos MG, Nishi MY, Brito VN, et al. Absence of inactivating mutations and deletions in the DMRT1 and FGF9 genes in a large cohort of 46,XY patients with gonadal dysgenesis. *Eur J Med Genet.* 2012;55(12):690–4.
46. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
47. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25(14):1754–60.
48. Tischler G, Leonard S. biobambam: tools for read pair collation based algorithms on BAM files. *Source Code Biol Med.* 2014;9(1):13.
-

49. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(16).
 50. MacArthur DG, Manolio TA, Dimmock DP, Rehm HL, Shendure J, Abecasis GR, et al. Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature.* 2014;508(7497):469–76.
 51. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405–23.
 52. John R. Edwards, Olya Yarychivska MB and THB. DNA methylation and DNA methyltransferases. *Epigenetics Chromatin.* 2017;10(23).
 53. Consortium EP. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 2012;489(7414):57–74.
 54. Siggens L, Ekwall K. Epigenetics, chromatin and genome organization: Recent advances from the ENCODE project. Vol. 276, *Journal of Internal Medicine.* 2014. p. 201–14.
 55. Lizio M, Harshbarger J, Shimoji H, Severin J, Kasukawa T, Sahin S, et al. Gateways to the FANTOM5 promoter level mammalian expression atlas. *Genome Biol.* 2015;16(1):22.
 56. Moran S, Arribas C, Esteller M. Validation of a DNA methylation microarray for 850,000 CpG sites of the human genome enriched in enhancer sequences. *Epigenomics.* Future Science Group; 2016 Mar;8(3):389–99.
 57. Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, et al. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics.* 2011;98(4):288–95.
 58. Chen Y, Lemire M, Choufani S, Butcher DT, Grafodatskaya D, Zanke BW, et al. Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium HumanMethylation450 microarray. *Epigenetics.* 2013 Feb 27;8(2):203–9.
 59. Hansen KD, Aryee M: Minfi: Analyze Illumina’s 450k Methylation Arrays. R package version 1.2.0.
 60. Ploner A. Heatplus: Heatmaps with row and/or column covariates and colored clusters. R package version 2.22.0. 2015.
 61. Du P, Zhang X, Huang C-C, Jafari N, Kibbe WA, Hou L, et al. Comparison of
-

- Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. *BMC Bioinformatics*. 2010;11(1):587.
62. McLachlan RI, Rajpert-De Meyts E, Hoei-Hansen CE, de Kretser DM, Skakkebaek NE. Histological evaluation of the human testis--approaches to optimizing the clinical value of the assessment: mini review. *Hum Reprod*. 2007 Jan 10;22(1):2–16.
63. Al-Zahrani J, Al-Dosari N, Abudheim N, Alshidi TA, Colak D, Al-Habit O, et al. Chromosome 12q24.31-q24.33 deletion causes multiple dysmorphic features and developmental delay: First mosaic patient and overview of the phenotype related to 12q24qter defects. *Mol Cytogenet*. 2011;4:9.
64. Brauner R, Picard-Dieval F, Lottmann H, Rouget S, Bignon-Topalovic J, Bashamboo A, et al. Familial forms of disorders of sex development may be common if infertility is considered a comorbidity. *BMC Pediatr*. 2016 Nov 29;16(1):195.
65. Sarafoglou K, Ostrer H. Familial Sex Reversal: A Review. *J Clin Endocrinol Metab*. Endocrine Society; 2000 Feb 14 [cited 2017 Jul 17];85(2):483–93.
66. Ramón Bilbao J, Loridan L, Castaño L. A novel postzygotic nonsense mutation in SRY in familial XY gonadal dysgenesis. *Hum Genet*. Springer-Verlag; 1996 Apr;97(4):537–9.
67. Assumpção JG, Benedetti CE, Maciel-Guerra AT, Guerra G, Baptista MTM, Scolfaro MR, et al. Novel mutations affecting SRY DNA-binding activity: the HMG box N65H associated with 46,XY pure gonadal dysgenesis and the familial non-HMG box R30I associated with variable phenotypes. *J Mol Med (Berl)*. 2002 Dec 1;80(12):782–90.
68. Cooper DN, Krawczak M, Polychronakos C, Tyler-Smith C, Kehrer-Sawatzki H. Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. *Hum Genet*. 2013 Oct 3;132(10):1077–130.
69. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May 5;17(5):405–23.
70. Rukova B, Staneva R, Hadjidekova S, Stamenov G, Milanova, Toncheva D. Genome-wide methylation profiling of schizophrenia. *Balkan J Med Genet*. 2014;17(2):15–23.
71. Achermann JC, Ozisik G, Ito M, Orun UA, Harmanci K, Gurakan B, et al.
-

- Gonadal determination and adrenal development are regulated by the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1, in a dose-dependent manner. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(4):1829–33.
72. Camats N, Pandey A V, Fernández-Cancio M, Andaluz P, Janner M, Torán N, et al. Ten novel mutations in the NR5A1 gene cause disordered sex development in 46,XY and ovarian insufficiency in 46,XX individuals. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Jul;97(7):E1294-306.
73. Domenice S, Machado AZ, Ferreira FM, Ferraz-de-Souza B, Lerario AM, Lin L, et al. Wide spectrum of NR5A1-related phenotypes in 46,XY and 46,XX individuals. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2016;108(4):309–20.
74. Garg V, Kathiriyia IS, Barnes R, Schluterman MK, King IN, Butler CA, et al. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature.* 2003 Jul 24;424(6947):443–7.
75. Bleichert F, Baserga SJ. The Long Unwinding Road of RNA Helicases. *Mol Cell.* 2007 Aug 3;27(3):339–52.
76. Colley A, Beggs JD, Tollervey D, Lafontaine DL. Dhr1p, a putative DEAH-box RNA helicase, is associated with the box C+D snoRNP U3. *Mol Cell Biol.* 2000 Oct;20(19):7238–46.
77. Jankowsky E, Gross CH, Shuman S, Pyle AM. Active Disruption of an RNA-Protein Interaction by a DExH/D RNA Helicase. *Science* (80-). 2001 Jan 5;291(5501):121–5.
78. de la Cruz J, Kressler D, Linder P, Faye G. Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem Sci.* Elsevier; 1999 May 1;24(5):192–8.
79. Sardana R, Liu X, Granneman S, Zhu J, Gill M, Papoulas O, et al. The DEAH-box Helicase Dhr1 Dissociates U3 from the Pre-rRNA to Promote Formation of the Central Pseudoknot. *PLoS Biol.* 2015;13(2).
80. Hiromi Hirata, Kazutoyo Ogino, Kenta Yamada, Sophie Leacock and RJH. Defective Escape Behavior in DEAH-Box RNA Helicase Mutants Improved by Restoring Glycine Receptor Expression. *J Neurosci.* 2013;33(37):14638–44.
81. Karaca E, Harel T, Pehlivan D, Jhangiani SN, Gambin T, Coban Akdemir Z, et al. Genes that Affect Brain Structure and Function Identified by Rare Variant Analyses of Mendelian Neurologic Disease. *Neuron.* 2015 Nov 4;88(3):499–513.
82. Sathya P, Tomkins DJ, Freeman V, Paes B, Nowaczyk MJ. De novo deletion 12q: report of a patient with 12q24.31q24.33 deletion. *Am J Med Genet.* 1999 May 21;84(2):116–9.
-

83. Al-Zahrani J, Al-Dosari N, Abudheim N, Alshidi TA, Colak D, Al-Habit O, et al. Chromosome 12q24.31-q24.33 deletion causes multiple dysmorphic features and developmental delay: First mosaic patient and overview of the phenotype related to 12q24qter defects. *Mol Cytogenet.* 2011;4:9.
 84. Plotner PL, Smith JL, Northrup H. Deletion 12q: a second patient with 12q24.31q24.32 deletion. *Am J Med Genet A.* Wiley-Liss Inc.; 2003 May 1;118A(4):350–2.
 85. Liao G, Chen L-Y, Zhang A, Godavorthy A, Xia F, Ghosh JC, et al. Regulation of androgen receptor activity by the nuclear receptor corepressor SMRT. *J Biol Chem.* American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2003 Feb 14;278(7):5052–61.
 86. Yoon H-G, Wong J. The Corepressors Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid Hormone Receptor and Nuclear Receptor Corepressor Are Involved in Agonist- and Antagonist-Regulated Transcription by Androgen Receptor. *Mol Endocrinol.* Oxford University Press; 2006 May 1;20(5):1048–60.
 87. Heinlein UAO. DEAD box for the living. *J Pathol.* 1998 Apr;184(4):345–7.
 88. Sandhu H, Lemaire L, Heinlein UAO. Male Germ Cell Extracts Contain Proteins Binding to the Conserved 3'-End of Mouse P68 RNA Helicase mRNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;214(2):632–8.
 89. Arun G, Akhade VS, Donakonda S, Rao MRS. mrhl RNA, a Long Noncoding RNA, Negatively Regulates Wnt Signaling through Its Protein Partner Ddx5/p68 in Mouse Spermatogonial Cells. *Mol Cell Biol.* 2012 Aug 1;32(15):3140–52.
 90. Sarkar M, Khare V, Guturi KKN, Das N, Ghosh MK. The DEAD box protein p68: a crucial regulator of AKT/FOXO3a signaling axis in oncogenesis. *Oncogene.* Nature Publishing Group; 2015 Nov 19 ;34(47):5843–56.
 91. Santos-Ahmed J, Brown C, Smith SD, Weston P, Rasoulpour T, Gilbert ME, et al. Akt1 protects against germ cell apoptosis in the postnatal mouse testis following lactational exposure to 6-N-propylthiouracil. *Reprod Toxicol.* 2011 Jan;31(1):17–25.
 92. Hixon ML, Boekelheide K. Expression and Localization of Total Akt1 and Phosphorylated Akt1 in the Rat Seminiferous Epithelium. *J Androl.* Blackwell Publishing Ltd; 2003 Nov 12;24(6):891–8.
 93. Zimmermann S, Moelling K. Phosphorylation and Regulation of Raf by Akt (Protein Kinase B). *Science.* 1999;286(5445).
 94. Liao RS, Ma S, Miao L, Li R, Yin Y, Raj G V. Androgen receptor-mediated non-
-

- genomic regulation of prostate cancer cell proliferation. *Transl Androl Urol*. 2013 Sep;2(3):187–96.
95. Shimada H, Rajagopalan LE. Rho kinase-2 activation in human endothelial cells drives lysophosphatidic acid-mediated expression of cell adhesion molecules via NF-kappaB p65. *J Biol Chem*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2010 Apr 23;285(17):12536–42.
96. Loke J, Pearlman A, Radi O, Zuffardi O, Giussani U, Pallotta R, et al. Mutations in MAP3K1 tilt the balance from SOX9/FGF9 to WNT/ β -catenin signaling. *Hum Mol Genet*. Oxford University Press; 2014 Feb 15;23(4):1073–83.
97. Syed V, Gomez E, Hecht NB. Messenger Ribonucleic Acids Encoding a Serotonin Receptor and a Novel Gene Are Induced in Sertoli Cells by a Secreted Factor(s) from Male Rat Meiotic Germ Cells. *Endocrinology*. Endocrine Society; 1999 Dec 7;140(12):5754–60.
98. Jonsson CK, Zetterström RH, Holst M, Parvinen M, Söder O. Constitutive Expression of Interleukin-1 α Messenger Ribonucleic Acid in Rat Sertoli Cells Is Dependent upon Interaction with Germ Cells ¹. *Endocrinology*. Endocrine Society; 1999 Aug 7;140(8):3755–61.
99. Nicholls PK, Harrison CA, Gilchrist RB, Farnworth PG, Stanton PG. Growth Differentiation Factor 9 Is a Germ Cell Regulator of Sertoli Cell Function. *Endocrinology*. Endocrine Society; 2009 May 9;150(5):2481–90.
100. Tobias ES, McElreavey K. Next generation sequencing for disorders of sex development. *Endocr Dev*. Karger Publishers; 2014;27:53–62.
-

9. Anexos

Anexo A:**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1 NOME:

NOME DO PAI:

NOME DA MÃE:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE No : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO.....No.....APTO:.....

BAIRRO.....CIDADE.....

CEP:.....TELEFONE (.....)

2.RESPONSÁVEL LEGAL.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor,curador etc.).....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO:No APTO:

.....

BAIRRO:.....CIDADE:.....

CEP:.....TELEFONE:(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA**1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA****Estudo dos genes relacionados ao distúrbio do desenvolvimento sexual**

PESQUISADOR : Berenie Bilharinho de Mendonça

CARGO/FUNÇÃO: Professora titular

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL No 20305

UNIDADE DO HCFMUSP: Endocrinologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐**4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos**

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____ Rubrica do pesquisador_____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas no endereço: LIM 42 do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, localizado na rua Eneas de Carvalho Aguiar, 255 São Paulo/SP. Telefone(s) 11 26617512. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5o andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____ Rubrica do pesquisador _____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo" Eu discuti com o Dr. Berenice B Mendonça sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data / /

Assinatura da testemunha Data / /

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data / /

Anexo B:

Procedimento Imunohistoquímico:

Desparafinização e Hidratação:

Montar conjuntos de lâminas silanizadas contendo os cortes de tecido de aproximadamente 3 à 4 µm de espessura, em suporte adequado.

Colocar as lâminas em xilol à quente, em estufa à 60 – 65° C, durante 10 à 20 minutos.

passar rapidamente em 3 banhos de xilol frio.

Colocar as lâminas em 2 banhos de álcool absoluto.

1 banho de álcool 95°.

1 banho de álcool 70°.

Lavar bem em água corrente.

Lavar com água ultra pura.

Mergulhar as lâminas em Ácido Fórmico por 3 minutos, lavar novamente em água corrente e água ultra pura.

Digestão ou recuperação antigênica:

Para a recuperação do antígeno utilizar alta temperatura em panela de Pressão Pascal (Dako) por 1 minuto à 125°C, onde as lâminas foram colocadas em solução de Citrato pH 6.0.

Após esse processo, lavar as lâminas em água corrente e água destilada.

Bloqueios:

Para o marcador DHX37 bloquear com água oxigenada por 5 minutos, repetindo-se essa operação quatro vezes. Posteriormente lavar com água corrente e água destilada, e com PBS ou TBS 3 vezes de 3 minutos.

Incubação com o anticorpo:

❖ **DHX37, titulação: 1:50, marca: Novus Biologicals, código: NBP 2-13922, lote: R44921**

Diluir adequadamente em Antibody Diluent, ref.:ADS-125, marca Spring.

Secar a lâmina ao redor dos cortes e colocando-as em câmara úmida.

Pipetar o anticorpo diluído sobre os cortes.

Incubar as lâminas em câmara úmida em geladeira overnight, (18 – 20 horas)

Lavar 3 vezes com PBS ou TBS, por 3 minutos.

Incubar as lâminas em câmara úmida com anticorpo secundário (polímero Novolink, marca Leica

por 30' à 37°C as duas etapas (pós primário e complexo).

Lavar com PBS ou TBS, por 3 vezes de 3 minutos.

Colocar as lâminas em solução com cromógeno (70 mg de DAB – diaminobenzidina) em 100 ml de tris-HCL PH 7.6 + 30 microlitros de Água Oxigenada 30 V.

Esperar a revelação por 5 minutos.

Lavar em água corrente por 10 minutos.

Contra corar em Hematoxilina de Harris, por + ou - 1 min.

Lavar em água corrente por 5 minutos.

Montagem:

Colocar as lâminas em suporte

Desidratar em banho de álcool 70°, ± 1 minuto.

Colocar em banho de álcool 95°, ± 1 minuto.

Colocar em 3 banhos de álcool absoluto, ± 1 minuto cada banho.

Diafanizar em 3 banhos de Xilol, ± 1 minuto cada banho.

Montar com lamínula e resina sintética.

Anexo C

Tabela 9 - Dados da análise de predição *in silico* das variantes identificadas em 8 pacientes com DDS 46,XY por anormalidades do desenvolvimento gonadal.

Paciente	Troca na proteína	Domínio funcional	Ferramentas de predição <i>in silico</i> *					
			Mutation Taster	Mutation Assessor	SIFT	Polyphen-2	CADD	GERP++
F1.III2 F1.III3 F2.II4 F2.III1 CE1.II1	p.Arg308Gln	DEAH/sítio de ligação ao ADP	Causadora de doença (escore: 0.999)	Alto impacto funcional (escore: 4.38)	Afeta a função da proteína (escore 0.001)	Provavelmente deletéria (escore 1.000)	35	5.3
CE2.II3 DHX37	p.Arg151Trp	desconhecido	Causadora de doença (escore: 0.999)	Médio impacto funcional (escore: 2.85)	Afeta a função da proteína (escore 0.001)	Possivelmente deletéria (escore 0.669)	NA	NA
CE3.II4	p.Ala48Thr	desconhecido	Causadora de doença (escore: 0.997)	Médio impacto funcional (escore: 2.865)	Afeta a função da proteína (escore 0.001)	Benigna (escore 0.338)	NA	3.14
CE4.II4	p.Arg674Trp	C-terminal	Causadora de doença (escore 1.000)	Alto impacto funcional (escore: 4.835)	Afeta a função da proteína (escore 0.001)	Provavelmente deletéria (escore 1.000)	33	4.2
	GATA4 p.Pro368Arg	desconhecido	Causadora de doença (escore 1.000)	Médio impacto funcional (escore: 2.255)	Afeta a função da proteína (escore 0.001)	Possivelmente deletéria (escore 0.997)	27.2	5.83

*Mutation Taster: escore; SIFT: escore <0.05; Polyphen: provavelmente deletéria (>=0.957), possivelmente deletéria (0.453<=pp2_hdiv<=0.956); benigna (pp2_hdiv<=0.452); CADD: escore alto é considerado deletério; GERP++: escore alto é considerado deletério.NA: não avaliado

Tabela 11 - Frequência genotípica e alélicas dos pacientes com DG 46,XY e dos indivíduos Brasileiros controles saudáveis e não saudáveis dos bancos de dados abraOM, SELA, LIM42 e nossa coorte de pacientes.

Gene	Registro no dbSNP	Variante	Frequência genotípica						Frequência alélica				Valor <i>P</i> (<0,05)
			Pacientes n(%)			Controles n(%)			Pacientes n(%)		Controles n(%)		
<i>DHX37</i>	rs78936225	c.142C>T	G/G	G/A	A/A	G/G	G/A	A/A	G	A	G	A	0,107515
			39 (97,5%)	1 (2,5%)	0	974 (99,5%)	5 (0,5%)	0	79 (98,8%)	1 (1,2%)	1953 (99,7%)	5 (0,3%)	
	rs577400960	c.451G>A	C/C	C/T	T/T	C/C	C/T	T/T	C	T	C	T	0,000002
			39 (97,5%)	0	1 (2,5%)	978 (99,9%)	0	1 (0,1%)	78 (97,5%)	2 (2,5%)	1956 (99,9%)	2 (0,1%)	
	ND	c.923C>T	G/G	G/A	A/A	G/G	G/A	A/A	G	A	G	A	NA
35 (87,5%)			5 (12,5%)	0	979 (100%)	0	0	75 (93,8%)	5 (6,2%)	1958 (100%)	0		
ND	c.2020G>A	C/C	C/T	T/T	C/C	C/T	T/T	C	T	C	T	NA	
			39 (97,5%)	1 (2,5%)	0	777* (100%)	0	0	79 (98,8%)	1 (1,2%)	1554* (100%)	0	
<i>GATA4</i>	rs775379687	c.1103C>G	39 (97,5%)	1 (2,5%)	0	777* (100%)	0	0	79 (98,8%)	1 (1,2%)	1554* (100%)	0	

*sem os controles do nosso banco de DNAs. ND: não disponível; NA: não avaliado.

Tabela 12 - Variantes missense no DHX37 e GATA4 encontradas nos bancos de dados populacionais 1000 Genomes, ExAC, Ensembl, ESP6500 e gnomAD.

Paciente	Gene	Herança; padrão	Posição cromossom ica	dbSNP	Troca no nucleotídeo	Troca de aminoácido	MAFs 1000 Genome (%; n=)	MAFs ESP6500 (%; n=)	MAFs ExAC (%; n=)	MAFs gnomAD (%; n=)
F1.III2 F1.III3 F2.II4 F2.III1 CE1.II1	DHX37	Autossômico dominante; heterozigoto	Chr 12: 125460022	ND	c.923C>T	p.Arg308Gln	Ausente	Ausente	Ausente	0,003% (1/30936)*
CE2.II3		Autossômico recessiva; homozigto	Chr12: 124980777	rs577400960	c.451G>A	p.Arg151Trp	0.02% (1/5007)	Ausente	0.01% (3/23616)	0,01% (14/159148)#
CE3.II4		Autossômico dominante; heterozigoto	Chr12: 124986230	rs78936225	c.142C>T	p.Ala48Thr	7% (34/4974)	0,4% (54/12952)	0,13% (164/121412)	0,15% (426/277194)*#
CE4.II4		Autossômico dominante; heterozigoto	Chr12: 125448965	ND	c.2020G>A	p.Arg674Trp	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	GATA4	Autossômico dominante; heterozigoto	Chr8: 11614549	rs775379687	c.1103C>G	p.Pro368Arg	Ausente	Ausente	Ausente	0,004% (11/246222)*

MAF: Frequência alélica menor (*menor allelic frequency*) ND: dado não disponível. ND: não disponível; *alelos analisados pelo genoma; #alelos analisados pelo exoma; *# alelos analisados pelo genoma e exoma.

Tabela 13 - Região promotora TSS200 hipometilada no gene DHX37 encontrada no pai da família 1 em relação aos seus filhos, membros da família 2 e controles.

	Família 1				Família 2		Controles		
Sonda; posição cromossômica	Localizacao do sítio CpGs	Paciente índice (F1.III2)	Irmão (F1.III2)	Pai (F1.II3)	Paciente índice (F2.II3)	Sobrinho (F2.III1)	Irmã do paciente índice e mãe do paciente F2.II2 (F2.II3)	Masculino	Feminino
cg24167975; chr12:12403944 1-124039777	TSS 200	0.2398	0.2359	0.1308	0.3544	0.2607	0.3119	0.4585	0.3522

Escore: Hipometilado: 0-0.2; hipermetilado: 0.8-1

Anexo D: Localização das variantes alélicas nas sequências das proteínas DHX37 e GATA4.

uc001luyg.2 hg19	KGRQAGGPGSKGPPPPVVLSTDKDTLKGVLASN	LVLPGKKKKTAPPLSKKEKPLTKKERVLOKILQ
uc001luyg.2 rheMac2	KGRQAGGPGSKGSPPPVVLSTDKDTLKGVLASN	LVLPGKKKKTAPPLSKKEKPLTKKERVLOKILQ
uc001luyg.2 calJac1	KGRQAGGPGSKDPPPTLVLSTDKDTLKGVLASN	LVLPGKKKKTAP--AQKQKPLTKKERVLOKILQ
uc001luyg.2 canFam2	KGRQAGGPGSKGPAFPVVLSTDKDTLKGVLASN	LVLPGKKKKTAPPPSKKEKPLTKKERVLOKILQ
uc001luyg.2 loxAfr3	KGRQAGGPGSKGPPPPVVLSTDKGTLKGVLASN	LVLPGKKKKTAPPLSKKEKPLTKKERVLOKILQ
uc001luyg.2 bosTau4	KGRQTAGGTSKGPFPVVLSTDKDTLKGVLASN	LVLPGKKKKTAPPLSKKEKPLTKKERVLOKILQ
uc001luyg.2 equCab2	RGRQAGGPGSKGPPPPVVLSTDKGTLKGVLASN	LVLPGRRKKTAPPLSKKEKPLTKKERVLOKILQ
uc001luyg.2 oryCun2	KGRQAGGPGSKSAPFPVVLSTDKDTLKGVLASN	LVLPGRRKKTRAPPP--KERPLSRKERVLOKILQ
uc001luyg.2 pteWam1	KGRQAGGPGSKGAPFPVVLSTDKGTLKGVLASN	LVLPGKKKKTAPPLPRK--RPLTKKERVLOKILQ
uc001luyg.2 rn4	KGRQAGGPGSKGPPPPVVLSTDKDTLKGVLASN	LVLPGKKKKTAPPPSKKEKPLTKKERVLOKILQ
uc001luyg.2 mm9	KGRQAGGPGSKGPPPPVVLSTDKGTLKGVLASN	LVLPGRRKKTAPPPSKKEKPLTKKERVLOKILQ
uc001luyg.2 cavPor3	KGRQAGGPGSKGPPPPVVLSTGEDVLKGVLASN	LVLPGKKKKTAPPPSKKEKPLTKKERVLOKILQ
uc001luyg.2 dipOrd1	KGRQAGGPGSKGPPPPVVLSTGEDVLKGVLASN	LVLPGKKKKTAPPPSKKEKPLTKKERVLOKILQ
uc001luyg.2 proCap1	-----KETLKGVLASN	LVLPGKKKKTAPPLPKKEKPLTKKERVLOKILQ
uc001luyg.2 ochPri2	KGRQAGGPGSKGAPFPVVLSTG-----	-----
uc001luyg.2 micMuri1	RGRQAGGPGSK--PPPPV-----	-----
uc001luyg.2 gorGor1	KGRQAGGPGSKGPPPPVVLSTDKDTLKGVLASN	LVLPGKKKKTAPPLSKKEKPLTKKERVLOKILQ
uc001luyg.2 monDom5	KGRQAGGPGSKGPPPPVVLSTDDRTLKGVLASN	LVLPGRRKKKPIPTTKKEKPLTKKERVLOKILQ
uc001luyg.2 felCat3	KGRQAGGPGSKGPPPPVVLSTDKGTLKGVLASN	LVLPGKKKKTAPPLAKKEKPLTKKERVLOKILQ
uc001luyg.2 ornAna1	-----KELLKGVLASN	LVLPGKKKKTAVTFQPKKEKPLTKKERVLOKILQ
uc001luyg.2 turTrui1	KGRQAGGPGSKGPPPPVVLSTDKGTLKGVLASN	LVLPGKKKKTAPPLSKKEKPLTKKERVLOKILQ
uc001luyg.2 anoCar1	RRRQGTARGGEGPPPAPEAVQVSTLDEALKGVLGGSN	LVLPSRRTKKTDV--ZKAEEKPLSKKQKILQKILQ
uc001luyg.2 macEug1	KGRQAGGPGSKGPPPPVVLSTG-----	-----
uc001luyg.2 galGal3	-----SRRRGPPPPVVLSTG-----	-----
uc001luyg.2 danRer6	-----	-----
uc001luyg.2 oryLat2	-----GGRLKGVLASN	LVLPGSKKKKNTSQKVVSRKRPLTKKERVLOKILQ
uc001luyg.2 xenTro2	-----SEQLKGVLASN	LVLPGSKKKK---LMRVKPLSRQKQKILQKILQ
uc001luyg.2 gasAcul1	-----GARLKGVLASN	LVLPGSKKKKASVIVPSSKPLTKKERVLOKILQ
uc001luyg.2 myoLuc1	KGRQAGGPGSKGPPPPVVLSTG-----	-----
uc001luyg.2 tetNig2	-----GSKLKGVLASN	LVLPGSKKKKTTSLSRVSTKPLTKKRQRRELOKILQ
uc001luyg.2 otoGar1	-----KGTLKGVLASN	LVLPGSKKKKAPPLSKKEKPLTKKERVLOKILQ
uc001luyg.2 dasNov2	-----	-----
uc001luyg.2 fr2	-----	-----
uc001luyg.2 eriBuri1	KGRQAGGPGSKGPPPPVVLSTDKDTLKGVLASN	LVLPGSKKKKARAPPPSKKEKPLTKKERVLOKILQ
uc001luyg.2 echTel1	KGRQAGGPGSKGPPPPVVLSTDKDTLKGVLASN	-----
uc001luyg.2 tupBell1	KGRQAGGPGSKGPPPPVVLSTDKDTLKGVLASN	-----
uc001luyg.2 speTri1	-----	-----
uc001luyg.2 petMar1	-----	-----
uc001luyg.2 taeGut1	-----	-----
uc001luyg.2 sorAra1	-----	-----
uc001luyg.2 tarSyr1	KGRQAGGPGSKGPPPPVVLSTDKDTLKGVLASN	-----
uc001luyg.2 vicPac1	-----CRGMPAESLGLPLQLSVWARM-----	-----
uc001luyg.2 choHof1	-----KGTLKGVLASN	LVLPGSKKKKARAPPLSKKEKPLTKKERVLOKILQ

Figura 24 - Alinhamento da proteína DHX37 de diferentes espécies com a variante p.Ala48Thr, indicada com uma caixa preta vazada, gerado pelo Polyphen.

uc00luyg.2 hg19	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH	R	KRRWPSAEEEEEEESSLEEESSLDEDPAAEPAE
uc00luyg.2 rheMac2	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH	R	KRRQPSAEEEE---SSSLEGESSLDEDPAAELAE
uc00luyg.2 calJac1	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH	R	KRCQPSAEEEE-----EEESSLDEDPAAEPAE
uc00luyg.2 canFam2	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH	R	KRYH-----ETEEE---SSSFSMSPEEAPATEPTE
uc00luyg.2 loxAfr3	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH	R	KRRRQS-----E---SSSEASADEALAAGQVE
uc00luyg.2 bosTau4	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH	R	KRRR-----EAESE---SSSVDSPPEEAPTDNRSE
uc00luyg.2 equCab2	FTTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH	R	KRRR-----EAESE---SSSFSMSPEEAPGTEQAQ
uc00luyg.2 oryCun2	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH	R	KRRRPSAEE-----GASASSPEEAPASE---
uc00luyg.2 pteVam1	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH	R	KRRRL-----EAESE---SSSVDSPPEEAPAAERVG
uc00luyg.2 rn4	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH	R	KRRRSSSTEE-----DSSSESSPEEVTADQ--R
uc00luyg.2 mm9	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH	R	KRRRSSSTEE-----DSSSESSPEEATADQ--R
uc00luyg.2 cavPor3	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH	R	KRRRQPSTEE-----SSSSESSPEEAPTDQ--G
uc00luyg.2 dipOrd1	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH	R	KRRRQPSSE-----SSSSESSPEVDPDPLQ--E
uc00luyg.2 proCap1	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH	R	KRRRHQS-----EE---SSSSESSPEEAMAGQEE
uc00luyg.2 ochPri2	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH	R	KRRRQPSSE-----SSSSESSPEEAPGSE---
uc00luyg.2 micMur1	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH	R	KRRRLPSAEE-----SSSSESSPEEAPAVEQTG
uc00luyg.2 gorGor1	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH		-----
uc00luyg.2 monDom5	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH	R	KRRRQPSEE-----SSSSESSPEEAMEAAPAV
uc00luyg.2 felCat3	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH		-----
uc00luyg.2 ornAna1	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH	K	KRRQ-----ELEAE---SSSSESSPEEATASEQTQV
uc00luyg.2 turTru1	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH	R	KRRH-----EAESE---SSSSESSPEEAPPAEPAE
uc00luyg.2 anoCar1	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH	R	KRRRTZA---EE---SSSSESSPEEAPPAEPAE
uc00luyg.2 macEug1	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH	K	KRRRQPS-----EE---SSSSESSPEEAPPAEPAE
uc00luyg.2 galGal3	-----		-----
uc00luyg.2 danRer6	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH	R	KRRR-----EAESE---SSSSESSPEEAPPAEPAE
uc00luyg.2 oryLat2	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH		-----
uc00luyg.2 xenTro2	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH		-----
uc00luyg.2 gasAcul	-----	R	KRWK-----EEDSE---SSSSESSPEEAPPAEPAE
uc00luyg.2 myoLuc1	-----		-----
uc00luyg.2 tetNig2	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH		-----
uc00luyg.2 otoGar1	-----	R	KRRRQPSVED-----SSSSESSPEEAPPAEPAE
uc00luyg.2 dasNov2	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH	R	KRRH--QS-----EE---SSSSESSPEEAPPAEPAE
uc00luyg.2 fr2	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH		-----
uc00luyg.2 eriEur1	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH	R	KRRH-----EAESE---SSSSESSPEEAPPAEPAE
uc00luyg.2 echTel1	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH	R	KRRQQLS-----EE---SSSSESSPEEAPPAEPAE
uc00luyg.2 tupBel1	YTSKLGTDMMHTREKADPVVVPQEKISSLSGAH	R	KRRRSSSTGE-----SSSSESSPEEAPPAEPAE
uc00luyg.2 speTri1	-----		-----
uc00luyg.2 petMar1	-----	R	GRRRAALKE-----SSSSESSPEEAPPAEPAE
uc00luyg.2 taeGut1	-----		-----
uc00luyg.2 sorAra1	-----		-----
uc00luyg.2 tarSyr1	-----	R	KRRRSSSTEE-----SSSSESSPEEAPPAEPAE
uc00luyg.2 vicPac1	-----	R	KRRH-----EAESE---SSSSESSPEEAPPAEPAE
uc00luyg.2 choHof1	-----	W	KRRQLS-----EE---SSSSESSPEEAPPAEPAE

Figura 25 - Alinhamento da proteína DHX37 de diferentes espécies com a variante p.Arg151Trp, indicada com uma caixa preta vazada, gerado pelo Polypehn.

QUERY	TTQVP---QFLYBAGFSS-----EDSIIGVITPR	VAAVAMSCRVAKEM---NLS-----QRVVSVQIRFE
sp G1QQ62#1	TTQVP---QFLYBAGVSS-----EDSIIGVITPR	VAAMAMSCRVAKEM---NLS-----QRVVSVQIRFE
sp UPI0001D53EF9#1	TTQVP---QFLYBAGVSS-----EDSIIGVITPR	VAAVAMSCRVAKEM---NLS-----QRVVSVQIRFE
sp G1SUG5#1	TTQVP---QFLYBAGVSS-----DDSGIGVITPR	VAAMAMSCRVAKEM---NLS-----QRVISVQIRFE
sp G1U363#1	TTQVP---QFLYBAGVSS-----DDSGIGVITPR	VAAMAMSCRVAKEM---NLS-----QRVISVQIRFE
sp G1MAN6#1	TTQVP---QFLYBAGVSS-----DNSIIGVITPR	VAAVAMSCRVAKEM---NLS-----QRVVSVQIRFE
sp E2RH23#1	TTQVP---QFLYBAGVSS-----DNSIIGVITPR	VAAVAMSCRVAKEM---NLS-----QRVVSVQIRFE
sp UPI00005A485C#1	TTQVP---QFLYBAGVSS-----DNSIIGVITPR	VAAVAMSCRVAKEM---NLS-----QRVVSVQIRFE
sp E1BNQ2#1	TTQVP---QFLYBAGVSS-----DNSVIGVITPR	VAAVAMSCRVAKEM---NLS-----PRVVSVQIRFE
sp G3STS4#1	TTQVP---QFLYBAGVSS-----DDSIIGVITPR	VAADITMSCRVAKEM---NLS-----QRVVSVQIRFE
sp UPI000179675B#1	TTQVP---QFLYBAGVSS-----DNSIIGVITPR	VAAMAMSCRVAKEM---NLS-----QRVVSVQIRFE
sp UPI0002235FB9#1	TTQVP---QFLYBAGVSS-----DDSIIGVITPR	VAADITMSCRVAKEM---NLS-----QRVVSVQIRFE
sp D4A1R0#1	TTQVP---QFLYBAGVSS-----EDSIIGVITPR	VAAVAMSCRVAKEM---NLS-----HRVVSVQIRFE
sp F7DHB6#1	TTQVP---QFLYBAGVSS-----DNSIIGVITPR	VAAMAMSCRVAKEM---NLS-----QRVVSVQIRFE
sp Q5DTX1#1	TTQVP---QFLYBAGVSS-----EDSIIGVITPR	VAAVAMSCRVAKEM---NLS-----HRVVSVQIRFE
sp Q6NZL1#1	TTQVP---QFLYBAGVSS-----EDSIIGVITPR	VAAVAMSCRVAKEM---NLS-----HRVVSVQIRFE
sp UPI00022B26B7#1	TTQVP---QFLYBAGVSS-----NNSIIGVITPR	VAAVAMSCRVAKEM---NLS-----QRVVSVQIRFE
sp F7F3D3#1	TTQVP---QFLYBAGVSS-----RDSIIGVITPR	VAAVVMSQRVAKEM---NLS-----HRVVSVQIRFE
sp UPI000155C4A9#1	TTQVP---QFLYBAGVSS-----RDSIIGVITPR	VAAVVMSQRVAKEM---NLS-----HRVVSVQIRFE
sp F7F3D7#1	TTQVP---QFLYBAGVSS-----RDSIIGVITPR	VAAVVMSQRVAKEM---NLS-----HRVVSVQIRFE
sp UPI00020F66B8#1	TTQVP---QFLYBAGVSS-----SDSGIGVITPR	VAAVAMSCRVAKEM---NLS-----QRVVSVQIRFE
sp F7EHN6#1	TTQVP---QFLYBAGVSS-----SDSGIGVITPR	VAAVAMSCRVAKEM---NLS-----QRVVSVQIRFE
sp UPI00020398B2#1	TTQVP---QFLYBAGVSS-----SGSGIGVITPR	VAAVVMSQRVAKEM---NLS-----RRVVSVQIRFE
sp F6U120#1	TTQVP---QFLYBAGVSS-----ENNDVIGVITPR	VAADVMSQRVAKEM---NLS-----QSVISVQIRFE
sp A2RV37#1	TTQVP---QFLYBAGFAS-----SGSGIGVITPR	VAADVMSQRVAKEM---NLS-----SGVVSVQIRFE
sp B8JLP0#1	TTQVP---QFLYBAGFAS-----SGSGIGVITPR	VAADVMSQRVAKEM---NLS-----SGVVSVQIRFE
sp UPI0001DE759E#1	TTQVP---QFLYBAGVSS-----ENNDVIGVITPR	VAADVMSQRVAKEM---NLS-----QSVISVQIRFE
sp UPI00017B2C0B#1	TTQVP---QFLYBAGVAT-----DSGIGVITPR	VAADVMSQRVAKEM---NLS-----TRVVSVQIRFE
sp UPI00017B2C0A#1	TTQVP---QFLYBAGVAT-----DSGIGVITPR	VAADVMSQRVAKEM---NLS-----TRVVSVQIRFE
sp UPI00016E713B#1	TTQVP---QFLYBAGVAT-----NSGIGVITPR	VAADVMSQRVAKEMTCQREML-----PRVVSVQIRFE
sp UPI00016E7122#1	TTQVP---QFLYBAGVAT-----NSGIGVITPR	VAADVMSQRVAKEMTCQREML-----PRVVSVQIRFE
sp UPI00022B45FD#1	TTQVP---QFLYBAGVAT-----DGRMIGVITPR	VAADVMSQRVAKEM---NLS-----TQVVSVQIRFE
sp G3NIK4#1	TTQVP---QFLYBAGVAT-----GSGIGVITPR	VAADVMSQRVAKEM---NLS-----TRVVSVQIRFE
sp Q4RSQ9#1	TTQVP---QFLYBAGVAT-----DSGIGVITPR	VAADVMSQRVAKEM---NLS-----TRVVSVQIRFE
sp UPI0000E45D43#1	TTQVP---QFLYBAGVAT-----KSGIGVITPR	VAADVMSQRVAKEM---NLS-----TSVVSVQIRFE
sp E9G568#1	TTQVP---QFLYBAGVAA-----NGKIIIGVITPR	VAADVMSQRVAKEM---NLS-----DGVVSVQIRFE
sp UPI0002063B62#1	TTQVP---QFLYBAGVAA-----E-KLIIIGVITPR	VAADVMSQRVAKEM---NLS-----EKEVSVQIRFE
sp UPI000180BA18#1	TTQVP---QFLYBAGVAA-----H-SMVVITPR	VAADVMSQRVAKEM---NLS-----TSKVSVQIRFE
sp F6YBA5#1	TTQVP---QFLYBAGVAA-----H-SMVVITPR	VAADVMSQRVAKEM---NLS-----TSKVSVQIRFE
sp Q7PQY6#1	TTQVP---QFLYBAGVGE-----RGLIIGVITPR	VAADVMSQRVAKEM---NLS-----TDVVSVQIRFE
sp E2BIK3#1	TTQVP---QFLYBAGVGE-----D-KLIIIGVITPR	VAADVMSQRVAKEM---NLS-----EKEVSVQIRFE
sp F6YU81#1	TTQVP---QFLYBAGVGE-----H-SMVVITPR	VAADVMSQRVAKEM---NLS-----TSKVSVQIRFE
sp B4Q185#1	TTQVP---QFLYBAGVAA-----H-KMIIIGVITPR	VAADVMSQRVAKEM---NLS-----ESVVSVQIRFE
sp B4MA33#1	TTQVP---QFLYBAGVAA-----H-KMIIIGVITPR	VAADVMSQRVAKEM---NLS-----SSEVVSVQIRFE
sp G5AWU7#2	TTQVP---QFLYBAGVSS-----DNSIIGVITPR	VAAVAMSCRVAKEM---NLS-----QRVVSVQIRFE
sp UPI00022C9AFF#1	-----	-----
sp UPI00021A8731#1	-----	-----
sp G3I130#1	-----	-----
sp E3WLG7#1	-----	-----
sp B4R3G4#1	-----	-----
sp G1MUN9#2	TTQVP---QFLYBAGVTS-----SNGIIGVITPR	VAADVMSQRVAKEM---NLS-----HRVVSVQIRFE
sp UPI000194D565#2	TTQVP---QFLYBAGVTS-----ASGAIIGVITPR	VAADVMSQRVAKEM---NLS-----HRVVSVQIRFE
sp UPI0000E810B7#2	TTQVP---QFLYBAGVTS-----SNGIIGVITPR	VAADVMSQRVAKEM---NLS-----HRVVSVQIRFE
sp E1C9C2#2	TTQVP---QFLYBAGVTS-----SNGIIGVITPR	VAADVMSQRVAKEM---NLS-----HRVVSVQIRFE
sp D3Z216#1	TTQVP---QFLYBAGVSS-----EDSIIGVITPR	VAAVAMSCRVAKEM---NLS-----HRVVSVQIRFE
sp C3YFT9#2	TTQVP---QFLYBAGVSS-----RDAMIIGVITPR	VAADVMSQRVAKEM---NLS-----QRVVSVQIRFE

Figura 26 - Alinhamento da proteína DHX37 de diferentes espécies com a variante p.Arg308Gln indicada com uma caixa preta vazada, gerado pelo Polyphen.

QUERY	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFGD-FEQFPPEITRR-PVEDL
sp G1QQ62#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RWVTQAPPQGR-WLTPPPSVVRPVVEDL
sp UPI0001D53EF9#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFGD-FEQFPPEITRR-PVEDL
sp G1SUG5#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFGD-FEQFPPEITRR-PVEDL
sp G1U363#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFGD-FEQFPPEITRR-PVEDL
sp G1MAN6#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFSD-FEQFPPEITRR-PVEDL
sp E2RHZ3#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFSD-FEQFPPEITRR-PVEDL
sp UPI00005A485C#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFSD-FEQFPPEITRR-PVEDL
sp E1BNQ2#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFGD-FEQFPPEITRR-PVEDL
sp G3STS4#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFGD-FEQFPPEITRR-PVEDL
sp UPI000179675B#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFGD-FEQFPPEITRR-PVEDL
sp UPI0002235FB9#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFGD-FEQFPPEITRR-PVEDL
sp D4A1R0#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFGD-FEQFPPEITRR-PVEDL
sp F7DHB6#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFGD-FEQFPPEITRR-PVEDL
sp Q5DTX1#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFGD-FEQFPPEITRR-PVEDL
sp Q6NZL1#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFGD-FEQFPPEITRR-PVEDL
sp UPI00022B26B7#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFGD-FEQFPPEITRR-PVEDL
sp F7F3D3#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVSWTSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFSD-FEQFPPEITRR-PVEDL
sp UPI00022B26B7#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFGD-FEQFPPEITRR-PVEDL
sp F7F3D3#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVSWTSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFSD-FEQFPPEITRR-PVEDL
sp UPI000155C4A9#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVSWTSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFSD-FEQFPPEITRR-PVEDL
sp F7F3D7#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVSWTSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFSD-FEQFPPEITRR-PVEDL
sp UPI00020F66B8#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VYSD-FEQFPPEITRR-PVEDL
sp F7EHN6#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VYSD-FEQFPPEITRR-PVEDL
sp UPI00020398B2#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFSD-FAEFTAPEITRR-PVEDL
sp F6U120#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVDTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFAD-FEQFPPEITRR-PVEDL
sp A2RV37#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVDTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFGD-FSLFSEAEITRR-PVEDL
sp B8JLP0#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVDTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFGD-FSLFSEAEITRR-PVEDL
sp UPI0001DE759E#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVDTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFAD-FEQFPPEITRR-PVEDL
sp UPI00017B2C0B#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVDTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFAD-FSLFSEAEITRR-PVEDL
sp UPI00017B2C0A#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVDTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFAD-FSLFSEAEITRR-PVEDL
sp UPI00016E713B#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVDTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFAD-FSLFSEAEITRR-PVEDL
sp UPI00016E7122#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVDTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFAD-FSLFSEAEITRR-PVEDL
sp UPI00022B45FD#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVDTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFAD-FSLFSEAEITRR-PVEDL
sp G3NIX4#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVDTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFGD-FTLFSEAEITRR-PVEDL
sp Q4RSO9#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVDTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFAD-FSLFSEAEITRR-PVEDL
sp UPI0000E45D43#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVDTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFGNDFETFDPEITRR-PVEDL
sp E9G568#1	DTGRVKTFFDKVTGVSFAFVHTWTSQASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFNDDEFKFSLPDIARR-PIDDL
sp UPI0002063B62#1	DCGKVKKRYIDRVTVGVSTYKVCYTSKASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFNNHFEQFSQSEIQRK-PVDDL
sp UPI000180BA18#1	DTGKVKRRYIDRVTVGVSTFRIGVWSKASADQQRAGRAG	TEAGHTY-RLFSSA-VFQ-DFEDFDLPEISSK-PVAGL
sp F6YBA5#1	DTGKVKRRYIDRVTVGVSTFRIGVWSKASADQQRAGRAG	TEAGHTY-RLFSSA-VFQ-DFEDFDLPEISSK-PVAGL
sp Q7PQ6#1	DTGRQKTKLYDKTGTGVTAFVVTYTSKASADQQRAGRAG	VAPGHY-RLYSSA-VFNDDEFVFAPEVQOK-PVDDL
sp E2BIK3#1	DSGRCKTRVYDHTGTGVTYQICVYSKASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VYNDQFEEYSQSEIQRK-PVDDL
sp F6YU81#1	DTGKVKRRYIDRVTVGVSTFRIGVWSKASADQQRAGRAG	TEAGHTY-RLFSSA-VFQ-DFEDFDLPEISSK-PVAGL
sp B4Q185#1	DCGRQKTRLYDKLTGVSFAFVVTYTSKASADQQRAGRAG	ISAGHCY-RLYSSA-VYNDCFEDFSQPDIOQK-PVEDL
sp B4MA33#1	DTGRQKTRLYDKLTGVSFAFVVTYTSKASADQQRAGRAG	VSAGHCY-RLYSSA-VYNDIIPDFSQPDIOQK-PVDDL
sp G5AWU7#2	DCGKVKKRYIDRVTVGVSSFRVTWVSQASADQQRAGRAG	TEPGHCYSSLEHAACFLTHPQVRPTPEGR-----
sp UPI00022C9AFF#1	DCGRCKTRMYDKVTGVSSTYRVCYTSKASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFNDQFEQFSQSEIQRK-PVDDL
sp UPI00021A8731#1	DCGRCKTRMYDKVTGVSSTYRVCYTSKASADQQRAGRAG	TEPGHCY-RLYSSA-VFNDQFEQFSQSEIQRK-PVDDL
sp G3I130#1	-----	-----
sp E3WLG7#1	DSGRQKTKLYDKTGTGVTAFVVTYTSKASADQQRAGRAG	VAPGHY-RLYSSA-VFNDDEFVFAPEVQOK-PVDDL
sp B4R3G4#1	DCGRQKTRLYDKLTGVSFAFVVTYTSKASADQQRAGRAG	ISAGHCY-RLYSSA-VYNDCFEDFSQPDIOQK-PVEDL
sp G1MUN9#2	-----	-----
sp UPI000194D565#2	-----	-----
sp D3Z216#1	-----	-----
sp C3YFT9#2	-----	-----
sp B4JWU3#2	-----	-----
sp E9IBM0#2	-----	-----
sp B4I9S7#1	-----	-----
sp B3MYT1#2	-----	-----
sp UPI0002247A66#2	-----	-----
sp E3WLG7#2	-----	-----
sp A7SGZ9#2	-----	-----
sp UPI00021A8731#2	-----	-----
sp D2A3P7#2	-----	-----
sp F4WPW3#2	-----	-----
sp UPI00022C9AFF#2	-----	-----
sp Q173G5#2	-----	-----
sp B0W6U6#2	-----	-----
sp E2AIT2#2	-----	-----
sp Q6NR37#2	-----	-----
sp Q9NFN0#2	-----	-----
sp Q46072#2	-----	-----

Figura 27 - Alinhamento da proteína DHX37 de diferentes espécies com a variante p.Arg674Trp indicada com uma caixa preta vazada, gerado pelo Polyphen.

Figura 28 - Alinhamento da proteína GATA4 de diferentes espécies com a variante p.Pro368Arg, indicada com uma caixa preta vazada, gerado pelo Polyphen